

# **TRÁFICO INTRACELULAR DEL TRANSPORTADOR DE GLICINA GLYT1**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**ENRIQUE FERNÁNDEZ SÁNCHEZ**

**MAYO DE 2010**



**MEMORIA PRESENTADA POR EL LICENCIADO  
ENRIQUE FERNÁNDEZ SÁNCHEZ  
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS**

**DIRECTOR DE LA TESIS:  
Dr. FRANCISCO ZAFRA GÓMEZ**

**CO-DIRECTOR DE LA TESIS:  
Dr. CECILIO GIMÉNEZ MARTÍN**













**Este trabajo ha sido realizado en el  
Departamento de Biología Molecular;  
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”  
(C.S.I.C- U.A.M)**



# Índice

	Abreviaturas	13
	I	
	Introducción	17
	I.1	La transmisión del impulso nervioso 19
	I.2	La glicina como neurotransmisor 20
	I.2.1	Neurotransmisión glicinérgica 20
	I.2.2	Neurotransmisión glutamatérgica 21
	I.3	Transportadores de glicina 22
	I.3.1	Localización y función de los transportadores de glicina en el sistema nervioso central 23
	I.3.2	Estructura de GLYT1 25
	I.3.3	Regulación de GLYT1 28
	I.4	Tráfico intracelular de proteínas de membrana 29
	I.4.1	Exportación de proteínas del retículo endoplasmático 29
	I.4.2	Endocitosis de proteínas de membrana 30
	I.4.2.2	<i>Endocitosis dependiente de clatrina</i> 31
	I.4.2.2	<i>Endocitosis independiente de clatrina</i> 33
	I.5	Ubiquitinación de proteínas 33
	I.5.1	La ubiquitinación como señal de endocitosis 34
	I.5.2	Endocitosis regulada por ubiquitinación de los miembros de la familia SLC6 35
	I.5.3	Deubiquitinación 35
	II	Objetivos 37
	III	Mareriales y métodos 41

III.1	Cultivo de células COS-7 y MDCK	43
III.2	Construcción de plásmidos	43
III.3	Transfección de células mediante lipofección	44
III.4	Electroforesis e inmunodetección	44
III.5	Técnicas de inmunofluorescencia en células en cultivo	45
III.6	Ensayo de transporte de glicina en células en cultivo	45
III.7	Marcaje de proteínas de membrana por biotinilación	46
III.8	Aislamiento de sinaptosomas	46
III.9	Solubilización y reconstitución de GLYT1 en proteoliposomas	47
III.10	Transporte de glicina en sinaptosomas y proteoliposomas reconstituidos	47
III.11	Purificación de proteínas de fusión	47
III.12	Ensayo de “Pull Down”	48
III.13	Ensayo de entrecruzamiento químico y centrifugación en gradiente de sacarosa	48
III.14	Microscopia FRET	49
III.15	Tratamiento con activadores e inhibidores	49
III.16	Estudios funcionales de electrofisiología	49
III.17	Ensayo de endocitosis de GLYT1 acoplado al dominio extracelular del receptor de NGF	50
III.18	Aislamiento de conjugados GLYT1/His-Ubiquitina	51
III.19	Herramientas bioinformáticas	51
IV	Resultados	53
IV.1	Tráfico de GLYT1 hacia la membrana plasmática	55
IV.1.1	El extremo carboxilo terminal de GLYT1 tiene señales de exportación del retículo endoplasmático	55

	IV.1.2	Formación de oligómeros de GLYT1	64
	IV.2	Tráfico de GLYT1 desde la membrana plasmática	73
	IV.2.1	GLYT1 es endocitado por una vía dependiente de clatrina	73
	IV.2.2	La endocitosis de GLYT1 depende de lisinas de su extremo carboxilo terminal	84
	V	Discusión	97
	V.1	Tráfico de GLYT1 a la membrana plasmática	99
	V.2	Endocitosis de GLYT1	103
	VI	Conclusiones	109
	VII	Resumen	113
	VIII	Bibliografía	117
	IX	AnexoI: Trabajos publicados	133



## ABREVIATURAS

- ▶ **ADN:** Acido desoxirribonucleico
- ▶ **AMPA:** Acido amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico
- ▶ **AMSH:** Associated molecule with the SH3 domain of STAM
- ▶ **ARNm:** Acido ribonucleico mensajero
- ▶ **BS<sup>3</sup>:** Bis(sulfosuccinimidyl)suberate
- ▶ **BSA:** Seroalbúmina bovina
- ▶ **CFP:** Proteína fluorescente cian
- ▶ **COPII:** Coatamer coat protein II
- ▶ **COS-7:** Células epiteliales de riñón de mono verde
- ▶ **DAT:** Transportador de dopamina
- ▶ **DMEM:** Medio Eagle modificado por Dulbeco
- ▶ **DMSO:** Dimetil sulfóxido
- ▶ **DSS:** Disuccinimidyl suberate
- ▶ **DTT:** Ditiotreititol
- ▶ **EAAC1:** Excitatory aminoacid carrier 1
- ▶ **EAAT2:** Excitatory aminoacid transporter 2
- ▶ **ECL:** Enhanced chemiluminescence
- ▶ **EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético
- ▶ **EGFR:** Epidermal growth factor receptor
- ▶ **ENaC:** Canal epitelial de sodio
- ▶ **EPS15:** Epidermal growth factor receptor substrate 15
- ▶ **FCS:** Suero fetal de ternera
- ▶ **FRET:** Fluorescence resonance energy transfer
- ▶ **GABA:** Ácido gamma amino butírico
- ▶ **GAT:** Transportador de GABA
- ▶ **GDP:** Guanidin di fosfato
- ▶ **GFP:** Proteína verde fluorescente
- ▶ **GLT1:** Transportador de glutamato 1
- ▶ **GLYT1:** Transportador de glicina 1
- ▶ **GLYT2:** Transportador de glicina 2

- ▶ **GST:** Glutation-S-transferasa
- ▶ **GTP:** Guanidin tri fosfato
- ▶ **GTPasa:** Guanidin trifosfatasa
- ▶ **HA:** Hemaglutinina
- ▶ **HBS:** Tampón salino HEPES
- ▶ **HEPES:** Ácido (N-[2-Hidroxietil]piperazine-N'-[etanosulfónico])
- ▶ **MDCK:** Mavin Davin canine kidney
- ▶ **Nedd4-2:** Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated gene 4
- ▶ **NET:** Transportador de norepinefrina
- ▶ **NGFR:** Nerve growth factor receptor
- ▶ **NMDA:** N-metil-D-aspartato
- ▶ **PBS:** Tampón fosfato salino
- ▶ **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- ▶ **PDZ:** Postsynaptic density 95/Disc large/Zonula occludens-1
- ▶ **PKC:** Proteína kinasa C
- ▶ **PMA:** Forbol 12-miristato 13-acetato
- ▶ **PMSF:** Phenylmethanesulfonylfluorid
- ▶ **PSD:** Postsynaptic density
- ▶ **RIPA:** Radio immuno precipitation assay
- ▶ **SDS:** Dodecil sulfato sódico
- ▶ **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida
- ▶ **S.E.M:** Error típico de la media
- ▶ **SERT:** Transportador de serotonina
- ▶ **SLC6:**Solute carrier families
- ▶ **SNARE:** Soluble NSF attachment protein receptors
- ▶ **SNAT:** Synaptic neutral aminoacid transporter
- ▶ **SNC:** Sistema nervioso central
- ▶ **TAUT:** Transportador de taurina
- ▶ **TCR:** Receptor de células T
- ▶ **TEVC:** Two electrodes voltage clamp
- ▶ **TGFβ:** Transforming growth factor *beta*
- ▶ **TRIS:** Trihidroximetilaminometano



- ▶ **UBPY (USP8):** Ubiquitin specific peptidase 8
- ▶ **UCH:** Ubiquitin c-terminal hydrolase
- ▶ **VIAAT:** Transportador vesicular de aminoácidos inhibitorios
- ▶ **VSVG:** Glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular
- ▶ **YFP:** Proteína amarilla fluorescente



## I. INTRODUCCIÓN

---



## I. 1 LA TRANSMISIÓN DEL IMPULSO NERVIOSO

La sinapsis es una diferenciación morfológica y funcional de las neuronas gracias a la cual se efectúa la comunicación de información entre neuronas adyacentes. Está constituida por la terminación de un axón, que se ensancha para formar el botón presináptico, el cual se encuentra en aposición a la membrana del cuerpo celular o de una dendrita de otra neurona; esta región recibe el nombre de región postsináptica. Entre la membrana presináptica y la postsináptica existe un espacio denominado hendidura sináptica que tiene una anchura de 20 a 50nm. En la mayor parte de las sinapsis (sinapsis químicas) la comunicación entre neuronas se realiza a través de sustancias químicas llamadas neurotransmisores.

Los neurotransmisores se almacenan en vesículas en el terminal nervioso y son liberados por la fusión de estas vesículas sinápticas con la membrana plasmática en una región especializada llamada zona activa. Este proceso de fusión es dependiente de calcio y se halla acoplado a la entrada de este catión a través de los canales dependientes de voltaje. La liberación de neurotransmisores responde, por tanto, a la despolarización de la membrana plasmática y termina cuando desaparece el  $\text{Ca}^{2+}$  de las zonas activas. Los neurotransmisores pueden ser excitadores como el glutamato o inhibidores como el GABA o la glicina. Los neurotransmisores excitadores producen la despolarización de la neurona postsináptica al aumentar la permeabilidad para  $\text{Na}^+$ , mientras que los inhibidores generan un potencial postsináptico inhibitorio, es decir, hiperpolarizan la neurona, al aumentar selectivamente la permeabilidad para  $\text{Cl}^-$ . La neurona integra señales excitadoras e inhibitorias de forma que si la suma resultante de todos los efectos sobrepasa el umbral de excitación, ésta genera un potencial de acción. No obstante, un determinado neurotransmisor puede ejercer simultáneamente funciones excitadoras, inhibitorias o moduladoras de las anteriores. La base de esta diversidad de acción ejercida por un mismo neurotransmisor radica en los diferentes tipos de receptores con los que interacciona, generando respuestas diferentes.

La mayor parte de los neurotransmisores son retirados del espacio sináptico mediante la actuación de transportadores específicos acoplados al potencial electroquímico de distintos iones como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ . Estos transportadores se encuentran localizados en la membrana de las neuronas presináptica, en la postsináptica o en las células de glía adyacentes. Los transportadores de neurotransmisores constituyen, por una parte, el mecanismo más importante para la terminación de la transmisión sináptica y, por otra, aseguran la disponibilidad de niveles adecuados y constantes del neurotransmisor en el interior de la neurona presináptica.

En el interior del terminal nervioso una parte del neurotransmisor es reciclado por almacenamiento en vesículas sinápticas, en donde queda a la espera de ser liberado de nuevo. Ese proceso es realizado por otro tipo de transportadores localizados en las membranas de las vesículas sinápticas. El mecanismo de transporte hacia el interior de las vesículas de almacenamiento está dirigido por el potencial electroquímico de protones generado por la acción de una  $\text{ATPasa-H}^+$ . Esta bomba de  $\text{H}^+$  acidifica el interior de la vesícula hasta un pH de 5.5, de forma que los sistemas de transporte usan el gradiente de pH y/o el potencial de membrana como fuente de energía.

Los neurotransmisores, después de ser liberados por el terminal nervioso, difunden en el espacio intersináptico e interactúan con sitios específicos de reconocimiento molecular que existen en la membrana de la neurona adyacente, los receptores postsinápticos y, en algunos casos, con la propia membrana de la misma neurona que los ha liberado, a través de los autorreceptores.

## I. 2 LA GLICINA COMO NEUROTRANSMISOR

En el SNC, la glicina tiene dos importantes funciones: por un lado actúa como neurotransmisor inhibitorio en neuronas glicinérgicas y por otro lado actúa como neurotransmisor activador al ser un co-agonista del receptor de glutamato NMDA en neuronas glutamatérgicas.

### I.2.1 Neurotransmisión glicinérgica

Tras la despolarización de las neuronas glicinérgicas, la glicina es liberada a la hendidura sináptica (Mulder et al., 1974). Al interactuar con su receptor postsináptico, la glicina genera un potencial postsináptico inhibitorio como resultado de un incremento en la conductancia de cloruro (Werman et al., 1967). Esta acción finaliza con la recaptura de la glicina mediante proteínas transportadoras específicas y de alta afinidad localizadas en la membrana plasmática de la neurona presináptica y de las células de glía adyacentes (Zafra et al., 1997).

La glicina presente en los terminales presinápticos se acumula en las vesículas sinápticas mediante la actividad del transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIAAT). Esta proteína co-transporta glicina o GABA junto con dos iones cloruro (Juge et al., 2009) al interior de las vesículas.

La glicina liberada en la sinapsis glicinérgica ejerce su acción inhibitoria al interactuar con el receptor postsináptico de glicina. Este receptor, cuyo antagonista más potente es la estricnina, actúa como un canal de cloruro al ser activado por glicina. El receptor de glicina consta de dos subunidades polipeptídicas integrales de membrana, las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Esta proteína permanece anclada al citoesqueleto mediante su interacción con una proteína periférica de membrana denominada gefirina (Kirsch et al., 1991).

La neurotransmisión glicinérgica cumple funciones importantes en el procesamiento de la información sensorial y motora. Por ejemplo, las interneuronas glicinérgicas de la médula espinal proporcionan un sistema de retroalimentación que coordina a las motoneuronas durante el movimiento (Werman et al., 1967). La glicina también juega un papel importante para el procesamiento de la información auditiva en los núcleos cocleares en el complejo de la oliva superior y en el colículo inferior (Wentholt et al., 1990). También se ha descrito que neuronas inhibitoras glicinérgicas actúan en el procesamiento de la información visual en la retina (Caruso et al., 1990). La neurotransmisión glicinérgica también tiene un papel importante en el procesamiento de la información nociceptiva mediante la modulación de las señales procedentes de los nociceptores periféricos ejercida por las interneuronas inhibitoras del asta dorsal de la medula espinal (Dohi et al., 2009) (Fig. 1A).

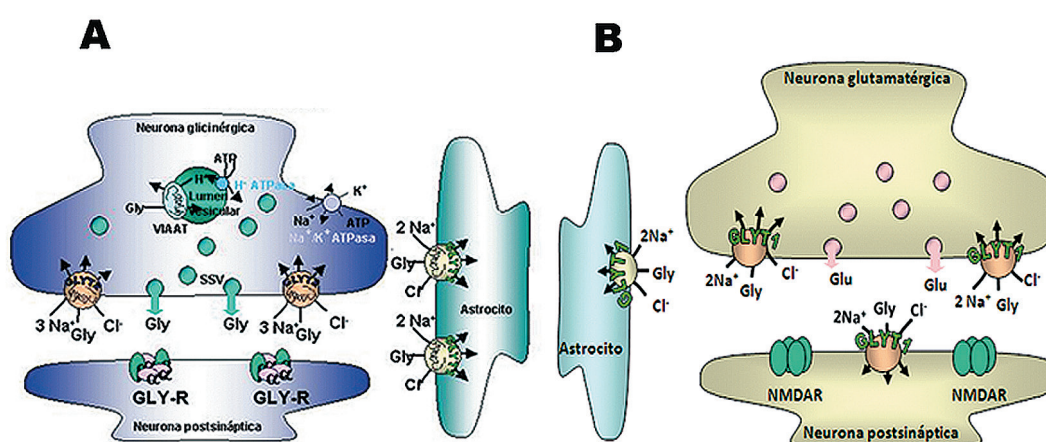


Figura 1. Esquemas de sinapsis glicinérgica (A) y de sinapsis glutamatérgica (B).

### I.2.2 Neurotransmisión glutamatérgica

Aparte de su papel inhibitor en la neurotransmisión glicinérgica, la glicina actúa como un neurotransmisor excitador al ser un co-agonista del receptor de glutamato NMDA (Betz et al., 2006). El receptor de NMDA es un canal catiónico operado por ligando que permite la permeación de iones  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  y presenta una serie de propiedades que los distinguen de otros canales iónicos dependientes de ligando. En primer lugar, estos receptores son bloqueados por concentraciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$ . En segundo lugar, los receptores de NMDA son altamente permeables al  $Ca^{2+}$  (Mayer et., 1987). La entrada de  $Ca^{2+}$  desencadena importantes procesos celulares, tales como el fenómeno plástico conocido como la potenciación a largo plazo (LTP), un modelo celular de memoria y aprendizaje (Bliss et al., 1993). Y en tercer lugar, el receptor de NMDA es el único receptor conocido que requiere la unión simultánea de dos agonistas, el glutamato y la glicina, para que el canal se abra eficientemente (Lerma et al., 1990). Este receptor desempeña un papel muy importante en la fisiología del cerebro y se ha visto que está implicado en numerosas patologías del sistema nervioso central (Dingledine et al., 1999).

Para que tenga lugar la máxima activación del receptor de glutamato NMDA, se requiere aparentemente la unión de dos moléculas de glutamato y dos de glicina (Benveniste et al., 1991; Clements et al., 1991). La unión de ambos neurotransmisores es necesaria para la apertura del canal y la entrada de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  al interior celular. La glicina interacciona con la subunidad NR1 del receptor. Esta interacción promueve la internalización de la proteína desde la membrana plasmática por una vía dependiente de clatrina (Kemp et al., 1993; Nong et al., 2003). No obstante, el sitio de unión de la glicina no parece exclusivo para dicha sustancia y también puede ser utilizado por D-serina. Durante las últimas décadas se ha desarrollado una intensa investigación en la búsqueda de antagonistas y agonistas del sitio de unión de glicina, ya que a través de este sitio de unión se puede modular la respuesta del receptor de glutamato NMDA en varias enfermedades del SNC (Jansen et al., 2003) (Fig. 1B).

### I. 3 TRANSPORTADORES DE GLICINA

Estudios bioquímicos clásicos demostraron la existencia de sistemas específicos de transporte de alta afinidad para glicina en terminales nerviosos y en células gliales (Johnston et al., 1971; Logan et al., 1972; Kuhar et al., 1978; Mayor et al., 1981; Zafra et al., 1986; Fedele et al., 1992). Estos sistemas de transporte acumulan glicina en contra de su gradiente de concentración a través de la membrana plasmática gracias al gradiente electroquímico de iones sodio y cloruro (Zafra et al., 1988; Lopez-Corcuera et al., 1998; Roux et al., 2000). Son proteínas que pertenecen a la familia de transportadores dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (familia SCL6 o NSS). Entre los miembros de esta familia están las proteínas encargadas de transportar dopamina, serotonina, GABA, norepinefrina y prolina.

Hasta la fecha se han clonado dos genes para dos transportadores de glicina diferentes, llamados GLYT1 y GLYT2 (Guastella et al., 1992; Smith et al., 1992; Liu et al., 1993; Borowsky et al., 1993; Kim et al., 1994; Adams et al., 1995). El primero presenta tres isoformas: GLYT1a, b y c. Las isoformas a y b se obtienen por la transcripción del gen de GLYT1 a través de la acción de distintos promotores, mientras que la isoforma c se obtiene por un proceso “splicing” alternativo del transcrito primario. Las secuencias peptídicas de estas tres isoformas son esencialmente idénticas excepto en una pequeña parte del extremo amino terminal y no presentan diferencias funcionales en cuanto a la actividad de transporte (Borowsky et al., 1993; Liu et al., 1993; Kim et al., 1994; Adams et al., 1995; Borowsky et al., 1998; Ponce et al., 1998; López-Corcuera et al., 1998). Es más, se sabe que el extremo amino terminal no es necesario para la función de transporte en ninguna de las formas (Olivares et al., 1994). Sin embargo, las tres isoformas presentan patrones de expresión diferentes, tanto en el sistema nervioso central como en tejidos periféricos (Borowsky et al., 1993), lo que sugiere un alto grado de especialización para cada una de ellas. Además, la zona diferencial de estas isoformas está implicada en procesos de tráfico intracelular específicos para cada una de ellas (Poyatos et al., 2000). El segundo transportador de glicina clonado, GLYT2, tiene dos isoformas (a y b) que difieren en cinco aminoácidos en el extremo amino entre ellas y presenta un 48% de homología de secuencia con GLYT1 (Ponce et al., 1998; Ebihara et al., 2004).

Entre ambos transportadores existen diferencias fisiológicas y farmacológicas importantes. Por un lado, estas proteínas difieren en la expresión celular y localización en el SNC. También



pueden ser distinguidas por la unión específica de una gran variedad de inhibidores de nueva generación que se han desarrollado durante los últimos años (Dohi et al., 2009), aunque la forma clásica de diferenciar farmacológicamente a los dos transportadores es la inhibición específica de GLYT1 por sarcosina y NFPS (N(3-(4'-fluorofenil)-3-(4'-fenilfenoxi)propil)sarcosina). Y por último, una diferencia muy importante entre ambos transportadores es la manera en que están acopladas termodinámicamente al gradiente de  $\text{Na}^+$  para transportar su sustrato. GLYT2 requiere la unión de tres iones sodio para transportar una molécula de glicina, mientras que GLYT1 sólo necesita dos para llevar a cabo este proceso (Aragón et al., 1987; Roux et al., 2000).

### I.3.1 Localización y función de los transportadores de glicina en el sistema nervioso central

La localización de la proteína y del ARNm de los transportadores de glicina se ha determinado mediante estudios de inmunocitoquímica e hibridación *in situ* (Guastella et al., 1992; Smith et al., 1992; Borowsky et al., 1993; Adams et al., 1995; Jursky et al., 1995; Luque et al., 1995; Zafra et al., 1995b; Zafra et al., 1995a). GLYT1 y GLYT2 se localizan principalmente en regiones caudales del SNC, aunque GLYT1 también se expresa a niveles moderados en áreas anteriores del cerebro.

Estudios de microscopía óptica y electrónica (Zafra et al., 1995a) revelan que GLYT1 se localiza principalmente en el SNC en células gliales. GLYT1 se expresa con niveles especialmente altos en las células de glía de la médula espinal, el tallo cerebral y el cerebelo. En la médula espinal, las prolongaciones de las células gliales inmunorreactivas para GLYT1 forman una red que rodea a las dendritas y a los cuerpos neuronales. Esta red es especialmente densa en el asta dorsal (láminas I y II) y alrededor de las motoneuronas (lámina IX) que reciben inhibición glicinérgica. En el cerebelo, GLYT1 se localiza principalmente en la glía de Bergmann y alrededor de las células granulares, mientras que en el tallo cerebral las regiones más inmunorreactivas son algunos núcleos del sistema auditivo, aunque también aparecen niveles altos de GLYT1 en otros núcleos sensoriales y motores. Además, se han encontrado concentraciones relativamente altas de esta proteína en algunas regiones del mesencéfalo y del cerebro anterior basal, como la estría terminal o el núcleo supraóptico, así como en la zona ventral del hipotálamo, la *substantia nigra*, los colículos y las neuronas amacrinas de la retina. Otras regiones que presentan una inmunorreactividad débil para GLYT1 son el *neocortex*, el hipocampo o los ganglios basales.

Recientemente, GLYT1 también se ha localizado en elementos neuronales asociado a vías glutamatérgicas del cerebro, como la capa molecular del cerebelo, el tálamo, el hipotálamo y en menor proporción, al bulbo olfativo, la corteza y el hipocampo. En estas vías, GLYT1 está enriquecido en los terminales presinápticos, donde colocaliza con el transportador de glutamato vGLUT1 (Cubelos et al., 2005). También se ha observado que está presente en densidades postsinápticas, donde se ha visto que está asociado con receptor de glutamato NMDA mediante su interacción con la proteína de andamiaje PSD-95 (Cubelos et al., 2005; Sur et al., 2007). Estos estudios indican que GLYT1 tiene una distribución óptima para controlar de manera precisa la concentración de glicina en estas regiones del SNC y por lo tanto, controlar su unión a los receptores de glutamato NMDA.

En cuanto a GLYT2, los experimentos de inmunocitoquímica indican que este transportador se encuentra en neuronas, principalmente en axones y terminales sinápticos de las regiones caudales del SNC. En la médula espinal la concentración de GLYT2 más alta se detecta en la sustancia gris, en particular en la lámina III en las astas dorsales, así como en las astas ventrales (lámina IX). Una gran densidad de botones sinápticos inmunorreactivos para GLYT2 rodean a

algunas neuronas, especialmente a las motoneuronas. En la sustancia blanca también aparecen axones positivos para GLYT2, especialmente en la zona cercana a la sustancia gris, abundante en axones cerebrospinales. También se ha descrito que GLYT2 se expresa en determinadas regiones del cerebelo, el tallo cerebral y el diencéfalo (Zafra et al., 1995a; Zafra et al., 1995b; Jursky et al., 1995; Spike et al., 1997)

Mediante estudios llevados a cabo en ratones deficientes en GLYT1 y GLYT2, se consiguió establecer la función principal de ambas proteínas en el SNC, y se descartó la posibilidad de que tuvieran un papel redundante en la neurotransmisión glicinérgica. En los ratones deficientes en GLYT1 se observó que neuronas del núcleo hipoglosal tenían una elevada conductancia del ion cloruro. Esto era debido a una activación permanente de los GlyR por una concentración extracelular de glicina muy elevada. También se observó que la constante de tiempo de las corrientes post-sinápticas inhibitoras eran mayores en estos ratones que en los ratones control. Todas estas observaciones llevaron a concluir que el papel principal de GLYT1 en el SNC es terminar la señal en las sinapsis glicinérgicas mediante la retirada de la glicina presente en la hendidura sináptica (Gomez et al., 2003). Sin embargo, se ha descrito que el bajo acoplamiento termodinámico del transportador al gradiente de sodio puede hacer que ésta proteína funcione en modo reverso expulsando glicina al medio extracelular (Aubrey et al., 2005; Roux et al., 2001). Esta liberación de neurotransmisor es independiente de  $\text{Ca}^{2+}$  y es relevante en determinadas situaciones fisiológicas o patológicas.

En cambio, la función de GLYT2 en el SNC parece ser la reposición del reservorio de glicina en las neuronas presinápticas. Esta conclusión se obtuvo de los datos obtenidos en neuronas del ratón deficiente en GLYT2, donde se vio que la amplitud de las corrientes postsinápticas inhibitoras eran menores que en las de neuronas control. Este hecho era debido a un déficit en la glicina liberada desde los terminales presinápticos en el ratón mutante. La dependencia de GLYT2 de un tercer ion sodio es una ventaja para esta función, ya que el gradiente termodinámico al que está acoplado el transporte de glicina permite mantener la elevada concentración intracelular del neurotransmisor, necesaria para el funcionamiento del transportador vesicular de baja afinidad de glicina (VIAAT/VGTA) presente en las neuronas glicinérgicas (Gomez et al., 2003). Sin embargo, esta dependencia del tercer ion sodio impone una restricción termodinámica que impide al transportador funcionar en modo reverso expulsando glicina al exterior celular.

El ratón homocigoto deficiente en GLYT1 no dio información sobre la participación del transportador en la neurotransmisión glutamatérgica. Estos ratones morían a las pocas horas de nacer debido a un fallo respiratorio producido por una disfunción en el control glicinérgico de las motoneuronas implicadas en la respiración. Por el contrario, el ratón heterocigoto deficiente en GLYT1 era aparentemente normal, exceptuando que presentaba una neurotransmisión glutamatérgica anómala. En estos ratones había una elevada respuesta NMDA/AMPA. Esto provocaba que los animales tuvieran una memoria espacial mejorada (Tsai et al., 2004). Estas respuestas fueron similares a las obtenidas mediante la inhibición farmacológica de GLYT1 *in vivo* con el inhibidor NFPS. En este caso, al elevarse la concentración extracelular de glicina, se potenció la función del receptor de glutamato NMDA (Kinney et al., 2003). Recientemente, se ha visto que un ratón condicional deficiente en GLYT1 en el cerebro anterior presentaba una memoria asociativa y una capacidad mayor de reconocer objetos que la de ratones control (Yee et al., 2006; Singer et al., 2007). Todos estos estudios indican que la función de GLYT1 en la sinapsis glutamatérgicas es la regulación de la concentración de glicina en las proximidades de los receptores de glutamato NMDA, ya

que cuando se reduce su expresión, o se inhibe farmacológicamente, se potencian las respuestas de estos receptores de glutamato, y en términos de comportamiento se produce una mejora cognitiva y tiene efectos antisicóticos (Bergeron et al., 1998; Chen et al., 2003; Gabernet et al., 2005).

Debido al doble papel que tiene la glicina en el SNC como neurotransmisor inhibidor en sinapsis glicinérgicas y como neurotransmisor excitador en sinapsis glutamatérgicas, en los últimos años se está desarrollando una intensa investigación en la búsqueda de inhibidores específicos de GLYT1. En varios estudios se ha observado que la inhibición farmacológica de esta proteína tiene efectos antisicóticos y anti-nociceptivos en modelos animales de enfermedades mentales o en modelos animales de dolor crónico e inflamación (Wolkenberg et al., 2010; Dohi et al., 2009). Así, se ha descrito que la inhibición de GLYT1 en neuronas glutamatérgicas aumenta la actividad del receptor de glutamato NMDA produciendo una mejora cognitiva. Este efecto antisicótico podría ser útil en el tratamiento de enfermedades como la esquizofrenia u otros desórdenes mentales en los que está implicado este receptor (Javitt 2009). También se ha visto que la inhibición de GLYT1 en determinadas regiones de la espina dorsal aumenta la cantidad de glicina en la hendidura sináptica y potencia la neurotransmisión de las interneuronas inhibitoras que modulan la señal de la nocicepción, lo cual podría constituir un tratamiento contra el dolor (Dohi et al., 2009).

### I.3.2 Estructura de GLYT1

GLYT1 es una proteína con 12 dominios transmembrana, con los extremos amino y carboxilo orientados hacia el interior celular. El transportador esta glicosilado en cuatro residuos de asparagina localizados en el bucle extracelular 2, el cual conecta los residuos transmembrana 3 y 4 (Olivares et al., 1995; Martinez-Maza et al., 2001). Esta predicción topológica, basada en la estructura secundaria de la proteína, está respaldada por la reciente resolución de la estructura tridimensional de un transportador bacteriano de leucina ( $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$ ) relacionado procedente de *Aquifex aeolicus* (Yamashita et al., 2005). Aunque la proteína sólo conserva entre el 20 -25% de los residuos presentes en la familia *SLC6*, estos parecen corresponder con los aminoácidos involucrados en el transporte del sustrato. La conservación de la secuencia es baja en los extremos amino y carboxilo, mientras que los bucles extracelulares e intracelulares son mayores en los transportadores eucariotas que en el bacteriano. Dentro de los diez primeros segmentos transmembrana,  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  presenta una estructura repetida formada en el plano de la membrana plasmática, que asocia los segmentos transmembrana 1-5 con los segmentos transmembrana 6-10. Los residuos involucrados en la unión del sustrato y el sodio están localizados en la interfaz entre los segmentos transmembrana 1 y 6. El sitio de unión para la leucina y el sodio están tapados por una compuerta externa formada por aminoácidos aromáticos (Tyr108 y Phe253) y un puente iónico (Arg130 y Asp404).  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  tiene otra compuerta interna orientada hacia el citoplasma compuesta por otro puente iónico (Arg5 y Asp369) que está estabilizado por numerosos residuos a su alrededor. Se ha propuesto que la unión del sustrato y del sodio ocurre cuando la compuerta extracelular está abierta y la intracelular cerrada. A continuación, hay un cambio conformacional que cierra la compuerta externa y abre la compuerta interna, permitiendo que el sustrato y el sodio alcancen el citoplasma (Yamashita et al., 2005).

La estructura de  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  se ha usado como molde para predecir la estructura de los miembros de la familia *SLC6*, incluyendo a GLYT1 y GLYT2. Los residuos que forman el bolsillo de unión de la leucina en  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  son sustituidos por unos más voluminosos en los transportadores de glicina formando un lugar de unión más pequeño. Los sitios de unión del sodio en  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$  parece que están con-

servados en GLYT1, aunque este detalle todavía no se ha comprobado experimentalmente. También mediante los modelos tridimensionales se ha identificado en el segmento transmembrana 6 el residuo responsable de la inhibición por sarcosina de GLYT1 (Gly305) (Vandenberg et al., 2007) (Fig. 2).

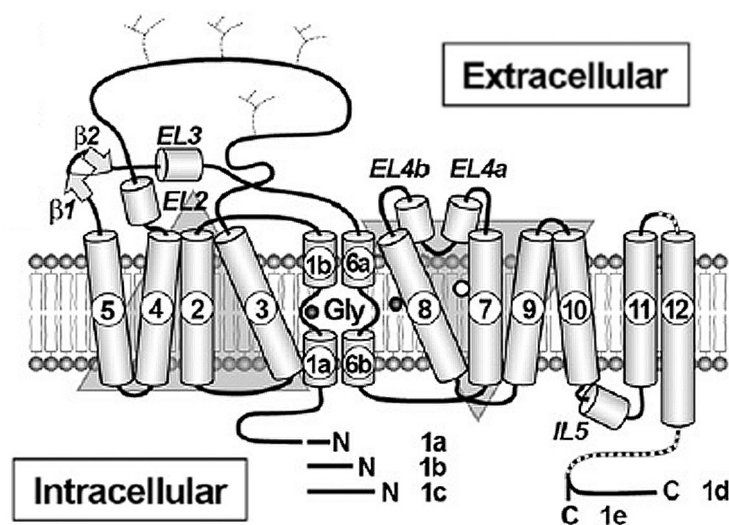


Figura 2. Esquema de la estructura de GLYT1.

Una particularidad de los miembros de la familia *SLC6*, que no tiene  $\text{LeuT}_{\text{Aa}}$ , es la dependencia del ion cloruro para el transporte. La presencia de un residuo ácido (Glu290) en el segmento transmembrana 7 es el responsable de la no-dependencia de cloruro en el transportador bacteriano (Zomot et al., 2007; Forrest et al., 2007). En GLYT1, el residuo equivalente (Ser 339) podría ser el responsable de la dependencia del ion cloruro en el ciclo de transporte, aunque todavía no se ha demostrado (Zafra et al., 2008).

El transportador bacteriano se cristaliza en forma de dímero (Yamashita et al., 2005). Aunque la unidad funcional de los miembros de la familia *SLC6* se cree que es el monómero, en estudios desarrollados recientemente se ha encontrado pruebas de que los transportadores forman dímeros, e incluso oligómeros, dentro de la membrana plasmática.

Utilizando tratamientos oxidativos se comprobó que el transportador de dopamina (DAT) forma dímeros y tetrámeros debido a un puente disulfuro entre proteínas distintas establecido por dos residuos de cisteína localizados en el segmento transmembrana 4. También mediante técnicas bioquímicas se obtuvieron pruebas de que el transportador de serotonina (SERT) forma oligómeros en células HEK 293. A través del acoplamiento de los fluoróforos CFP e YFP a los transportadores de dopamina, serotonina y GABA (GAT), se comprobó en experimentos de FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer), que estas proteínas forman dímeros en células transfectadas. Los resultados de estos trabajos sugieren que la formación de oligómeros de los miembros de esta familia es un requisito para pasar el estricto sistema de control de calidad del retículo endoplasmático (Møllerup et al., 1984; Berger et al., 1994; Jess et al., 1996; Kitayama et al., 1999; Kilic et al., 2000; Schmid et al., 2001; Hastrup et al., 2001; Norgaard et al., 2002; Sorkina et al., 2003; Just et al., 2004; Sitte et al., 2004; Farhan et al., 2006).

En una investigación llevada a cabo en GAT1, se propuso que la interfaz por donde los transportadores formaban los oligómeros era un motivo tipo cremallera de leucinas en el segmento transmembrana 2 (Scholze et al., 2002). Sin embargo, el modelado por homología de esta proteína indica que este segmento transmembrana no está expuesto a la superficie, haciendo poco probable que esa región del transportador esté implicada en la oligomerización (Zafra et al., 2008). Estudios similares en el transportador de serotonina sugirieron que el contacto entre los transportadores ocurría a través de una región incluida en los segmentos transmembrana 11 y 12 (Just et al., 2004). Este análisis se ajusta mejor a los datos obtenidos de LeuT<sub>Aa</sub>, ya que la interfaz en la que se forma el dímero está entre los segmentos transmembrana 9 y 12. Sin embargo, entre los miembros de la familia *SLC6*, hay una excepción descrita en la formación de oligómeros. Inicialmente GLYT1 y GLYT2 se describieron como monómeros en la membrana plasmática en análisis hidrodinámicos del transportador purificado de membranas de tallo cerebral de cerdo y en estudios bioquímicos realizados en oocitos de *Xenopus laevis* (Horiuchi et al., 2001; Lopez-Corcuera et al., 1993).

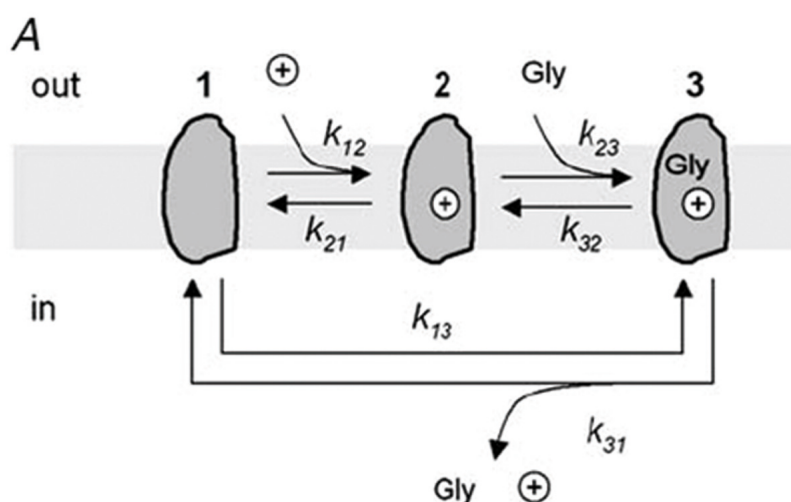


Figura 3. Esquema del modelo cinético de GLYT1.

Recientemente se ha propuesto un modelo cinético de GLYT1 basado en registros electrofisiológicos obtenidos en oocitos de *Xenopus laevis* (Fig. 3) (Cherubino et al., 2009). Este modelo propone que el ciclo de transporte de glicina consta de tres pasos definidos por tres estados distintos del transportador: T1, T2 y T3. El primer paso del ciclo consistiría en la unión de los iones sodio a la proteína dando lugar a la transición entre los estados T1 y T2 del transportador. Posteriormente, la glicina se uniría al estado T2 generando el estado T3. Desde esta forma, el transportador volvería al estado T1 después de liberar la glicina y los iones sodio al interior celular. El estado T1 es la forma de la proteína en el que está abierta la compuerta extracelular. Cuando se une la glicina al estado T3, el transportador sufre un cambio conformacional en el que se cierra la compuerta externa y se abre la compuerta interna. Una vez liberados la glicina y los iones sodio al citoplasma, el transportador vuelve a sufrir otro cambio conformacional en el que se cierra la compuerta interna y se abre de nuevo la externa para comenzar otro ciclo de transporte. El equilibrio entre los estados T1 y T2



es el paso limitante del transporte y representa el estado pre-estacionario del transportador. En este equilibrio, el sodio se une y se desune de la proteína generando un movimiento de cargas dentro de la membrana que posteriormente se convierten en corrientes de transporte en presencia de glicina.

### I.3.3 Regulación de GLYT1

Se sabe muy poco de la regulación transcripcional y post-traducional de los transportadores de glicina. Respecto al control de la transcripción, la expresión de GLYT1 está regulada por miembros de la familia de factores de transcripción HMGN3 que se unen al gen del transportador *in vivo* controlando su transcripción (West et al., 2004). Dichos factores se expresan en células de glía y en la retina colocalizando con GLYT1. Otro factor transcripcional que regula la expresión de la proteína es el factor específico de neuronas TRB1 que se une a elementos en la región 5' del promotor *in vitro* (Wang et al., 2004).

La expresión GLYT1 en glía también está regulada por las neuronas que se encuentran a su alrededor en un mecanismo que todavía no se conoce. La eliminación de neuronas de un cultivo primario mixto por un proceso citotóxico causa una disminución en la expresión del transportador (Zafra et al., 1997).

El tráfico de GLYT1 está controlado por la glicosilación del bucle extracelular 2 durante su transición en el aparato de Golgi y por interacciones no caracterizadas con el extremo carboxilo terminal del transportador (Poyatos et al., 2000). De manera similar, señales en esta región del transportador controlan la interacción de la proteína con la maquinaria de exocitosis y con motivos PDZ (Cubelos et al., 2005). La interacción con la maquinaria de exocitosis es importante para la inserción de GLYT1 en la membrana plasmática, mientras que la interacción con motivos PDZ estabiliza la proteína en regiones específicas de la neurona a través de su unión a la proteína PSD95 (Cubelos et al., 2005).

El reciclaje de GLYT1 de la superficie de los terminales presinápticos está regulado por la interacción con la proteína SNARE, syntaxina 1A que se une física y funcionalmente al transportador (Geerlings et al., 2000; Gerrlings et al., 2001).

Estudios anteriores determinaron que la activación de la PKC promueve la endocitosis de GLYT1 y GLYT2, al igual que ocurre con otros miembros de la familia *SLC6* (Fornes et al., 2004; Gomeza et al., 1995). Sin embargo, hasta ahora no se conocían ni el destino, ni los mecanismos por los cuales el transportador se internaliza en respuesta a la activación de esta proteína. Debido a que la PKC se activa por el receptor de glutamato NMDA, este mecanismo de regulación podría ser importante en el control de la concentración de glicina en las proximidades de este receptor. Aunque la activación de la PKC, a través del éster de forbol PMA, aumenta la fosforilación de GLYT1 y de otros miembros de la familia, aun se desconoce si este proceso es necesario para la endocitosis del transportador.

Otros mecanismos de regulación asociados a vías glutamatérgicas incluyen la inhibición de GLYT1 por ácido araquidónico, por iones zinc y por protones. Estas sustancias también son moduladores de los receptores de glutamato NMDA, y por lo tanto, una regulación coordinada del transportador y del receptor ayudaría a modular las respuestas a través del receptor de glutamato (Pearlman et al., 2003; Ju et al., 2004; Aubrey et al 2000).

## I.4 TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA

La membrana plasmática de las células eucariotas es una bicapa lipídica que separa el medio extracelular del medio intracelular. Aparte de los elementos lipídicos que la componen, la membrana tiene una gran variedad de proteínas transmembrana que se encargan de funciones tan diversas como la señalización, la captación de nutrientes, la adhesión o el reconocimiento de otras células. La composición proteica de la membrana plasmática no es invariable, sino que está constantemente siendo remodelada en respuesta a señales procedentes del interior celular o del medio que la rodea. Existen varios procesos por los cuales una célula regula la presencia de una determinada proteína en la membrana plasmática. Sin embargo, hay dos que destacan especialmente: la inserción en la membrana plasmática de proteínas que han sido sintetizadas y exportadas desde el retículo endoplasmático y la endocitosis de proteínas desde la superficie celular a hasta compartimentos intracelulares.

### I.4.1 Exportación de proteínas del retículo endoplasmático

En las células de mamífero el transporte de proteínas entre la membrana y los orgánulos es llevado a cabo por vesículas y es un proceso altamente regulado y selectivo. Las vesículas deben su selectividad a las cubiertas proteicas que las recubren. Cada cubierta funciona en un paso determinado del transporte intracelular, siendo específica para un sitio de exportación en la membrana del orgánulo donante, para las moléculas que va a transportar la vesícula y para la selección del orgánulo aceptor (Bickford et al., 2004). Las células tienen varios tipos de cubiertas proteicas que abarcan la selectividad necesaria para los distintos y complejos tipos de transporte intracelular, sobre todo, en células polarizadas como las células epiteliales o las neuronas.

La cubierta proteica COPII promueve la formación de vesículas que llevan proteínas recién sintetizadas desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi. La proteína que recluta los componentes de la cubierta de COPII a un lugar específico de la membrana del retículo endoplasmático (sitios de salida) pertenece a la familia de las proteínas G y se llama Sar1. El primer paso en la formación de la vesícula exocítica es el intercambio de GDP por GTP en Sar1 mediante la acción de Sec12. La forma de Sar1 unida a GTP interacciona con un determinado sitio de la membrana del retículo comenzando una serie de reclutamientos de proteínas que darán como resultado una vesícula recubierta por COPII. Mediante la unión a la proteína Sec16, Sar1 recluta al complejo proteico Sec23/Sec24. El complejo Sar1-Sec23/Sec24 interacciona directamente con las proteínas que van a ser exportadas y a través de adaptadores como TANGO también interacciona con moléculas solubles que se incluirán en el interior de las vesículas. La unión del complejo Sar1-Sec23/Sec24 a las proteínas diana que van a abandonar el retículo genera una curvatura en la membrana. A continuación, se recluta al heterodímero Sec13/Sec31 que polimeriza en la superficie de la membrana terminando de formar la cubierta proteica de COPII. Finalmente, cuando se hidroliza la molécula de GTP que está unida a Sar1, la vesícula se libera y la cubierta de COPII se desensambla en sus componentes individuales (Budnik et al., 2009; Russell et al., 2010).

En relación a los motivos proteicos de exportación reconocidos por Sec24 y Sar1, diversos estudios han permitido clasificarlos en tres tipos: Uno di-acídico, uno di-hidrofóbico o di-aromático y otro di-básico. El motivo di-acídico cuya secuencia consenso es [D/E]X[D/E] es necesario para la exportación a la membrana plasmática de proteínas como el canal de potasio Kir2.1 o la proteína VSVG en células de mamífero (Nishimura et al., 1997; Ma et al., 2001; Barlowe 2003).

Los motivos di-hidrofóbicos o di-aromáticos (FF, LL, II, vv, YY, FY) son utilizados para la salida del retículo endoplasmático de proteínas como ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment-53) o p24 (Domínguez et al., 1998; Nufer et al., 2002; Wendeler et al., 2007). Y por último, el motivo de exportación di-básico, que se ajusta a la secuencia [RK](X)[RK], se encuentra en los extremos citoplasmáticos de glicosiltransferasas (Giraudo et al., 2003) (Fig. 4).

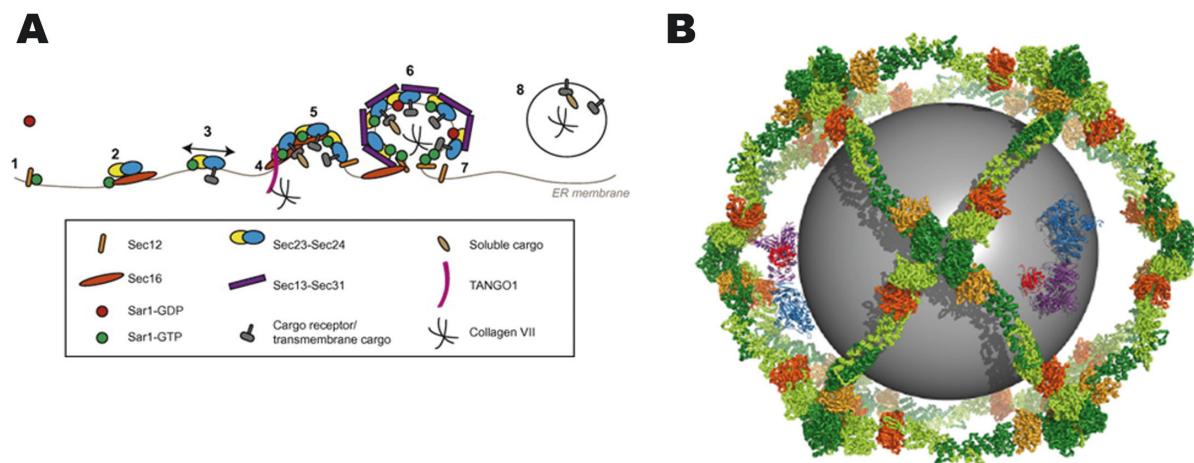


Figura 4. A. Proceso de formación de vesículas de exportación del retículo endoplasmático. B. Esquema tridimensional de una vesícula recubierta de COPII.

En los miembros de la familia *SLC6* existen determinadas secuencias de aminoácidos en los extremos carboxilo de los transportadores que son importantes para el tráfico intracelular de las proteínas y la llegada a la membrana plasmática (Olivares et al., 1994; Melikina et al., 1999; Torres et al., 2003; Farhan et al., 2004; Sitte et al., 2004; Miranda et al., 2004; Torres et al., 2005). Así por ejemplo, se ha descrito que la mutación de los aminoácidos del extremo carboxilo terminal de DAT Gly585, Lys590 o Asp600 provocan la retención del transportador en compartimentos intracelulares (Miranda et al., 2004). Un resultado similar también se ha descrito para GAT1, en cuyo extremo carboxilo terminal existen dos segmentos discontinuos necesarios para que el transportador alcance la superficie celular (Farhan et al., 2004).

#### I.4.2 Endocitosis de proteínas de membrana

La endocitosis es un proceso celular básico que utiliza la célula para internalizar una gran variedad de moléculas. Este proceso está altamente regulado por diversos tipos de señales y consta de varias etapas: reconocimiento de la proteína que se va a internalizar, formación de la vesícula endocítica y fusión de la vesícula con la membrana del compartimento intracelular diana.

Se han identificado varios mecanismos que utilizan las células para endocitar los diferentes tipos de moléculas. Estos mecanismos difieren en la carga que transportan y en la maquinaria que facilita el proceso de internalización. Las diferentes vías de endocitosis que utilizan las células se pueden clasificar en cuatro tipos distintos que se resumen en la Figura 5: fagocitosis, pinocitosis, endocitosis dependiente de clatrina y endocitosis independiente de clatrina (Mayor et al., 2007).



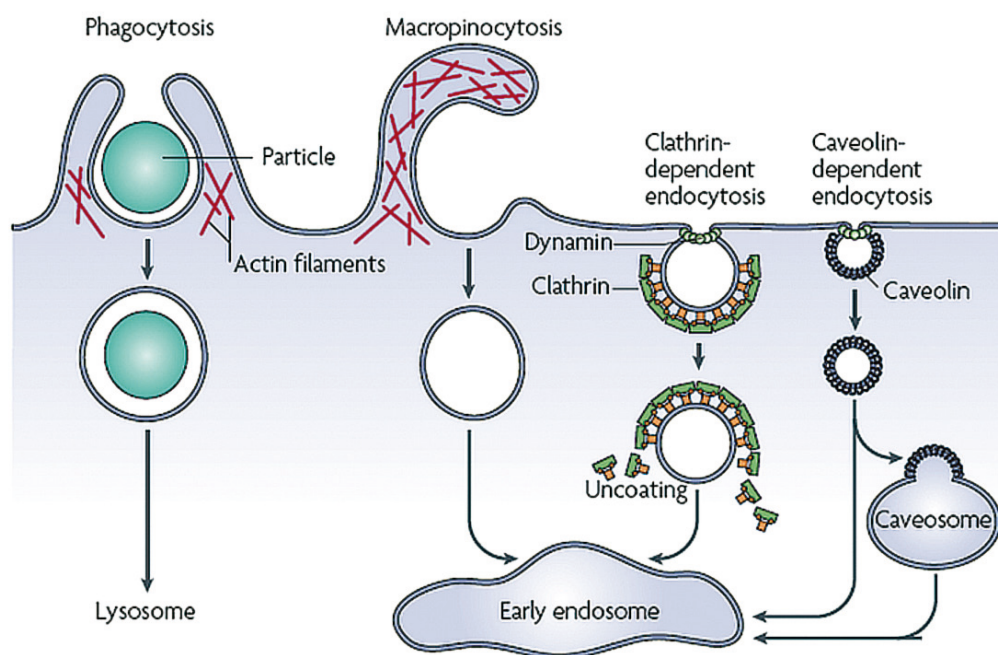


Figura 5. Esquema de los diferentes tipos de endocitosis de las células de mamífero.

La fagocitosis es un proceso por el cual la célula internaliza partículas de gran tamaño, generalmente microorganismos, mientras que la pinocitosis es el proceso por el cual las células incorporan fluidos del medio extracelular. Ambos mecanismos de internalización se basan en la evaginación de la membrana plasmática para rodear a los materiales que la célula va a incorporar y se caracterizan porque introducen vesículas de gran tamaño ( $> 1 \mu\text{m}$ ) en el interior celular. Estos procesos los llevan a cabo células especializadas y dependen de la modificación de la membrana plasmática por los filamentos de actina (Mayor et al., 2007).

La endocitosis regulada de proteínas de membrana se clasifica en vías dependientes de clatrina y vías independientes de clatrina. Ambas rutas de internalización tienen una regulación muy estricta y constituyen las vías por las que se endocitan la mayor parte de las proteínas de membrana. Estos procesos de endocitosis se explican con más detalle a continuación.

#### 1.4.2.1 Endocitosis dependiente de clatrina

La endocitosis dependiente de clatrina constituye la vía mayoritaria de internalización de proteínas en células eucariotas. El destino inicial de las proteínas endocitadas a través de una vía dependiente de clatrina son los endosomas tempranos. Desde estos compartimentos intracelulares, las proteínas pueden volver la membrana plasmática por un proceso de reciclaje, dirigirse a otros orgánulos celulares o ser degradadas en los lisosomas (Ungewickell et al., 2007).

La endocitosis dependiente de clatrina está altamente regulada y en ella participan una gran variedad de proteínas, entre las cuales, la clatrina, la dinamina y los diferentes tipos de adaptadores tienen un papel relevante.

La clatrina es un protómero en forma de trisquelion compuesto por tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras que polimeriza de forma poliédrica y recubre ciertas vesículas celulares que se escinden de la membrana plasmática (Young, 2007).

La dinamina es un GTPasa de 100 kDa encargada de la fisión de las vesículas que emergen de la membrana plasmática y de otras membranas celulares. Esta proteína oligomeriza formando unos anillos que rodean y constriñen la base de la invaginación de la membrana. Su propia oligomerización estimula la actividad GTPasa necesaria para la escisión final de la vesícula (Praefcke et al., 2004).

Los adaptadores son los encargados de reconocer, por medio de señales específicas, las proteínas que van a ser internalizadas. Estas proteínas se pueden clasificar en dos tipos: el adaptador tetramérico AP-2 y los denominados CLASPs (co-assembled clathrin-associated sorting proteins) entre los que se encuentran ARH, DAB2,  $\beta$ -arrestina 1 y 2 o EPS15. (Traub et al., 2009)

La formación de la vesícula endocítica comienza con el reclutamiento a la membrana plasmática de los diferentes tipos de adaptadores. A estas proteínas se unen las moléculas de clatrina que polimerizan y comienzan a formar la cubierta proteica. A continuación, por la acción de determinadas proteínas, la membrana se empieza a deformar e invaginar. A través de la fuerza realizada por la polimerización de filamentos de actina alrededor de la membrana que se está invaginando, se empieza a formar la vesícula con las proteínas que van a ser internalizadas en su interior. Por último, la constricción ejercida por la oligomerización de la dinamina en la base de la vesícula hace que ésta se escinda, desensamblándose a continuación los componentes de la cubierta proteica para poder volver a formar otra vesícula en la membrana plasmática (Traub et al., 2009) (Fig. 6).

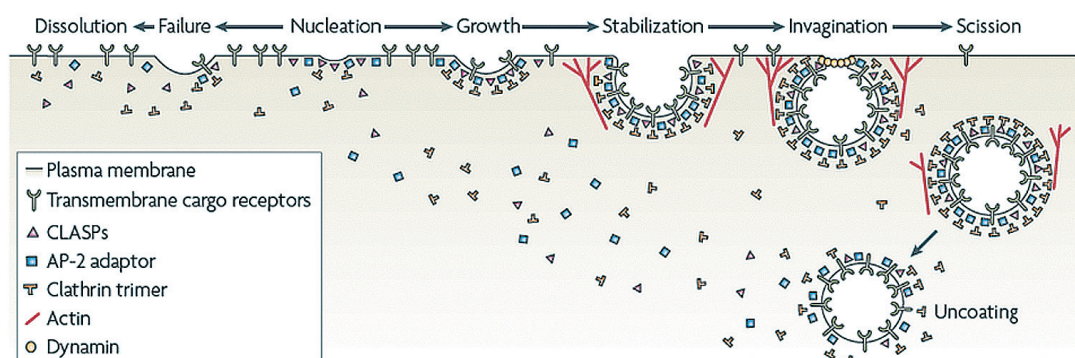


Figura 6. Esquema de la formación de vesículas recubiertas de clatrina.

Las señales de internalización son determinadas secuencias de aminoácidos o modificaciones postraduccionales localizadas en los extremos citoplasmáticos de las moléculas que van a ser endocitadas. Existen diferentes tipos de señales de endocitosis descritas hasta la fecha: motivos basados en tirosinas (YXX $\phi$ ), motivos di-leucinas ([DE]XXXL[LI]), motivos tipo FXNPXY y la ubiquitinación de las proteínas diana. Los distintos tipos de adaptadores son los encargados de reconocer estas señales. De este modo, el adaptador tetramérico AP-2 reconoce por medio de sus distintas subunidades los motivos YXX $\phi$  y [DE]XXXL[LI], mientras que los diferentes tipos de adaptadores monoméricos reconocen los motivos tipo FXNPXY y la ubiquitinación de las proteínas diana (Ungewickell et al., 2007).

### I.4.2.2 Endocitosis independiente de clatrina

Entre las vías de endocitosis independientes de clatrina la más conocida es la vía dependiente de caveolina. Esta vía de internalización está asociada a unas estructuras llamadas caveolas, que son invaginaciones de la membrana plasmática ricas en colesterol y en la proteína integral de membrana caveolina 1. Al igual que ocurre en la endocitosis dependiente de clatrina, la fisión de la vesícula de la membrana plasmática depende también de la GTPasa dinamina (Mayor et al., 2007). Las proteínas endocitadas a través de esta vía son conducidas a un órgano celular llamado caveosoma (Fig. 7). Este compartimento intracelular tiene un pH neutro y se caracteriza por presentar un alto contenido en caveolina 1 (Hanzal-Bayer et al., 2007). Entre las proteínas que se endocitan a través de esta vía se encuentran receptores como el de dopamina (Genedani et al., 2005) o transportadores como el de glutamato EAAC1 (González et al., 2007).

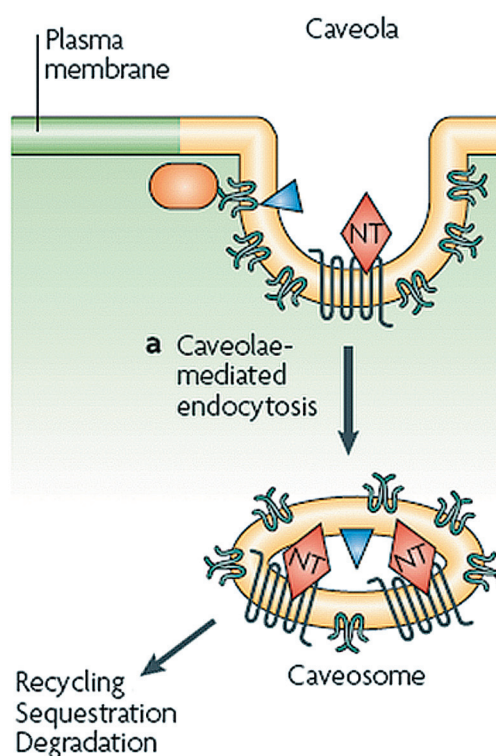


Figura 7. Esquema de la formación de vesículas recubiertas de caveolina.

## I.5 UBIQUITINACIÓN DE PROTEÍNAS

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraduccional que comprende la unión covalente del polipéptido de 76 aminoácidos ubiquitina a las proteínas diana (Urbe, 2005). La unión de moléculas de ubiquitina a determinadas proteínas puede actuar como señal en numerosos procesos celulares tales como la degradación proteica, la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, la regulación del ciclo celular o la endocitosis de proteínas de membrana. Varios es-

tudios han mostrado la implicación de los procesos de ubiquitinación en la regulación de proteínas del SNC. Así, el sistema de ubiquitinación regula la estabilidad y el tráfico de numerosas proteínas presinápticas y postsinápticas (Haas et al., 2008).

El proceso de ubiquitinación se lleva a cabo mediante la acción secuencial de tres enzimas. La enzima E1 activa la molécula de ubiquitina mediante una reacción dependiente de ATP que forma un enlace tioéster entre la cisteína presente en su sitio activo y el extremo C-terminal de la molécula de ubiquitina. La ubiquitina activada se transfiere a la cisteína del sitio activo de una enzima E2 y, a veces, al sitio activo de una ligasa E3. En la última reacción, catalizada por una E2 con ayuda de la E3 o directamente por la E3, se forma un enlace isopeptídico entre el extremo C-terminal de la molécula de ubiquitina y en grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina de la proteína diana. La generación de cadenas de multiubiquitina está mediada por la unión repetida de moléculas de ubiquitina a la lisina 48 o a la lisina 63 de otra ubiquitina (D'Azzo et al., 2005).

### I.5.1 La ubiquitinación como señal de endocitosis

Las primeras evidencias de que la ubiquitinación actuaba como señal de endocitosis de proteínas de membrana se obtuvo de unos transportadores de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En este estudio se vio que una cepa de levaduras deficiente en el proceso de endocitosis acumulaba las formas ubiquitinadas de estos transportadores (Kolling et al., 1994). Posteriormente, se han identificado numerosas proteínas de membrana de células eucariotas que son ubiquitinadas antes de su internalización. Entre los distintos tipos de proteínas de membrana que son ubiquitinadas como señal para su endocitosis hay canales, receptores y transportadores (Traub et al., 2007) (Fig. 8).

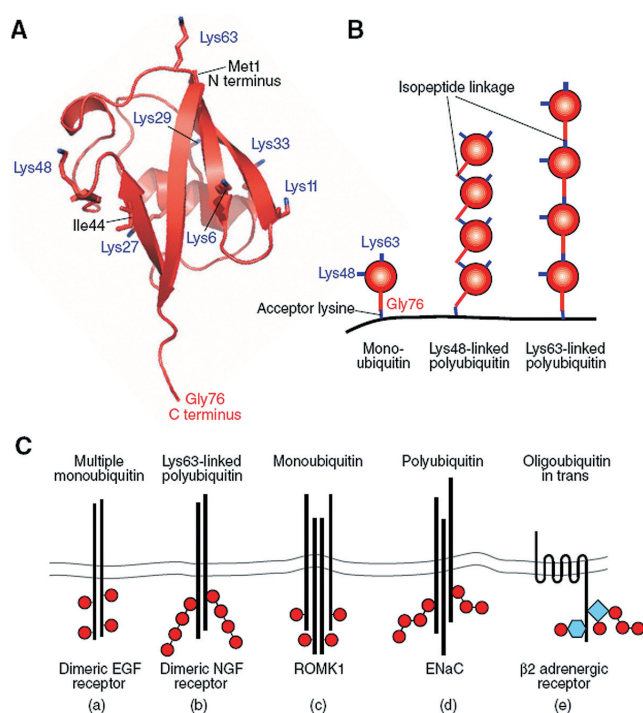


Figura 8. A. Molécula de ubiquitina. B. Esquema de los distintos modos de ubiquitinación. C. Modelos de ubiquitinación de proteínas para su endocitosis.

Muchas proteínas transmembrana son ubiquitinadas en cis para su internalización, es decir, que una o varias moléculas de ubiquitina se unen directamente a ciertas lisinas de la proteína diana. Mientras que otras proteínas, como el receptor  $\beta 2$  adrenérgico, son ubiquitinadas en trans, es decir, que las moléculas de ubiquitina se unen a los adaptadores de la maquinaria de endocitosis que interacciona con la proteína diana. Se han descrito varias formas de cómo las proteínas de membrana son ubiquitinadas. Estas formas distintas de ubiquitinación dependen de las lisinas existentes en los extremos citoplasmáticos de las proteínas dianas. Así por ejemplo, el receptor de EGF es monoubiquitinado múltiples veces, mientras que el receptor de NGF es poliubiquitinado (Traub et al., 2007) (Fig. 8).

Las moléculas de ubiquitina unidas a las proteínas diana que van a ser internalizadas son reconocidas por adaptadores monoméricos de la maquinaria de endocitosis dependiente de clatrina. Uno de estos adaptadores es EPS15. Esta proteína tiene un motivo de interacción con ubiquitina (UIM) por el cual se une a la molécula que va a ser internalizada. A parte del UIM, EPS15 tiene varios dominios más a través de los cuales interacciona con clatrina, con el adaptador AP-2 y con fosfolípidos (Traub et al., 2007). En varios estudios se ha observado que el silenciamiento genético de esta proteína impide la endocitosis mediada por ubiquitinación de proteínas como el receptor de EGF (Sigismund et al., 2005) o el receptor  $\beta 2$  adrenérgico. (Barriere et al., 2006).

### I.5.2 Endocitosis regulada por ubiquitinación de los miembros de la familia SLC6

Durante años el mecanismo por el cual los miembros de la familia *SLC6* se endocitaban en respuesta a la activación de la PKC no había sido resuelto. Sin embargo, recientemente se ha descrito la importancia de la ubiquitinación en la internalización del transportador de dopamina (DAT) y de otros receptores (Miranda et al., 2007). En este estudio se describe como DAT es ubiquitinado por la ubiquitin ligasa Nedd4-2 en varias lisinas intracelulares y como la mutación de estas lisinas impide que el transportador se endocite en respuesta a la activación de la PKC. Este hecho indica que las moléculas de ubiquitina que se unen a las lisinas mutadas sirven como plataforma de anclaje a los adaptadores de la maquinaria de endocitosis dependiente de clatrina (Sorkina et al., 2005; Sorkina et al., 2006).

### I.5.3 Deubiquitinación

Las deubiquitinasas son proteasas que catalizan la rotura del enlace isopeptídico que une a la molécula de ubiquitina con la proteína diana o con otra molécula de ubiquitina. Este tipo de enzimas tienen numerosas funciones en la fisiología celular y su actividad regula procesos como la regulación del ciclo celular, la degradación de proteínas, la reparación del ADN o el tráfico intracelular de proteínas. El genoma humano codifica aproximadamente 100 deubiquitinasas distintas que se clasifican en cinco familias distintas en función de su estructura (Reyes –Turcu et al., 2009)

Una de las funciones de estas enzimas es la separación de las moléculas de ubiquitina de las proteínas diana, en lo que sería el proceso contrario a la ubiquitinación. La eliminación de las moléculas de ubiquitina permite el reciclaje de proteínas que habían sido internalizadas en respuesta a esta señal de endocitosis. Así, se ha descrito como la deubiquitinasa UCH L3, perteneciente a la familia UCH (ubiquitin c-terminal hydrolase), cataliza la deubiquitinación del canal epitelial de sodio para permitir el reciclaje de la proteína a la membrana plasmática (Butterworth et al., 2007).





## II. OBJETIVOS

---





La glicina tiene dos importantes funciones en el sistema nervioso central: por un lado actúa como neurotransmisor inhibitorio en neuronas glicinérgicas y por otro lado actúa como neurotransmisor activador al ser un co-agonista del receptor de glutamato NMDA en neuronas glutamatérgicas. La acción de la glicina es finalizada mediante la recaptura del neurotransmisor de la hendidura sináptica por transportadores de alta afinidad. GLYT1 es una proteína perteneciente a la familia *SLC6* encargada de finalizar la señalización neuronal y regular la intensidad y la duración de la neurotransmisión en las sinapsis glicinérgicas inhibitorias y glutamatérgicas excitatorias. La localización precisa de este transportador en la membrana plasmática de neuronas o de células gliales es un proceso altamente regulado que resulta del balance entre la retirada de la proteína de la superficie celular y la inserción de nuevos transportadores procedentes del retículo endoplasmático. En relación al tráfico intracelular de los miembros de la familia *SLC6*, en estudios anteriores se había descrito que determinadas secuencias en el extremo carboxilo terminal, así como la formación de oligómeros, son importantes para la exportación de estos transportadores desde el retículo endoplasmático. Mientras que respecto a la retirada de estas proteínas de la membrana plasmática se sabe que la activación de la PKC promueve su endocitosis, aunque el mecanismo por el que esto ocurre no está bien definido.

Debido a la función que desarrolla GLYT1 en el sistema nervioso central es importante conocer los mecanismos que regulan la presencia del transportador en la superficie celular. Por este motivo los objetivos de esta tesis son:

1. Identificación de motivos de tráfico de GLYT1 hacia la membrana plasmática y caracterización de los mecanismos implicados.
2. Estudio y relevancia fisiológica de la formación de oligómeros de GLYT1.
3. Caracterización la vía de internalización constitutiva y de la regulada por PKC de GLYT1.
4. Identificación de los mecanismos moleculares que regulan la endocitosis constitutiva y la mediada por PKC del transportador GLYT1.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

---



### III.1 CULTIVO DE CÉLULAS COS-7 Y MDCK

La línea celular COS-7 (American Type Culture Collection) proviene de fibroblastos de riñón de mono verde africano. Resultó de la transformación de la línea CV-1 con un virus defectivo de SV40, dando lugar a la línea celular que expresa constitutivamente el antígeno T. Estas células se cultivaban en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero de ternera fetal al 10%. La línea celular MDCK (Madin-Darby canine kidney) proviene de epitelio renal de perro y se cultivaban en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Ambas líneas celulares se cultivaban y se mantenían a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

### III.2 CONSTRUCCIONES DE PLÁSMIDOS

Todos los mutantes de GLYT1 utilizados en los distintos experimentos se prepararon usando GLYT1b de rata en pCDNA3 como molde. Las mutaciones se hicieron con un kit de mutagénesis dirigida (QuickChange, Stratagene) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La construcción GLYT2 $\Delta$ ct se generó por PCR insertando un codón STOP en el oligonucleótido reverso después del aminoácido 748 de la secuencia de GLYT2 de rata. Para poder clonar el fragmento generado en el plásmido pCDNA3, se insertaron las dianas de restricción HindIII y BglII en los oligonucleótidos directo y reverso respectivamente. La quimera GLYT2-GLYT1ct se realizó por PCR en dos pasos. Primero, el fragmento de GLYT2 de rata comprendido entre los aminoácidos 1-748 se amplificó y se clonó en pCDNA3 como se hizo para GLYT2 $\Delta$ ct (sin insertar el codón STOP). A continuación, el fragmento de GLYT1 comprendido entre los aminoácidos

565-638 (GLYT1ct) se amplificó con un oligonucleótido directo conteniendo la diana de restricción BamHI y un oligonucleótido reverso conteniendo la diana de restricción XbaI. Finalmente, el fragmento GLYT1ct generado se clonó en las dianas BamHI y XbaI de la construcción GLYT2 1-748/pCDNA3. La construcción VSVG (vesicular-stomatitis virus glycoprotein)-GLYT1ct también se generó en dos pasos. Primero, la secuencia de aminoácidos de VSVG comprendida entre 1-498 se amplificó por PCR, con oligonucleótidos conteniendo las dianas HindIII y BamHI, y se clonó en esas mismas dianas en el plásmido pCDNA3. A continuación, el fragmento GLYT1ct se clonó en las dianas BamHI y XbaI de la construcción de VSVG generada, manteniendo la fase de lectura. La elaboración de las construcciones de GST-GLYT1ct se realizaron clonando el fragmento GLYT1ct en fase de lectura con el extremo carboxilo terminal de la GST en el plásmido pGEX-5X.

Para insertar los fluoróforos YFP y CFP en las distintas construcciones, se amplificaron por PCR usando como molde los plásmidos pYPet-His y pCyPet-his. Una vez amplificados, los cADN de las proteínas fluorescentes se clonaron en las dianas BamHI y EcoRI del plásmido pCDNA3. Posteriormente, un cADN de GLYT1b al que se le había eliminado el codón STOP se clonó en fase de lectura en las dianas HindIII y BamHI de las construcciones CFP/pCDNA3 e YFP/pCDNA3.

### III.3 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MEDIANTE LIPOFECCIÓN

Las células COS-7 y MDCK tenían un crecimiento rápido, con una duplicación cada 24 horas aproximadamente, de forma que se realizaban subcultivos cada 48-72 horas. Una vez las células habían alcanzado el crecimiento exponencial, a partir del subcultivo número 5, podían ser transfectadas con una eficiencia elevada. La eficiencia de la transfección descendía notablemente a partir de los 30 pases, tras los cuales las células eran desechadas. Para las transfecciones se utilizó la relación  $\mu\text{g}$  de ADN/ reactivo de lipofección que indicaba el fabricante para cada tamaño de placa. La transfección se realizaba usando el sistema comercial de lipofección Lipofectamina Plus (Gibco) para las células COS-7, o lipofectamina 2000 para las células MDCK. Las células se transfectaban cuando estaban a un 60-70% de confluencia y se incubaban con la mezcla que contenía el ADN y los reactivos de lipofección en el medio de transfección sin suero durante 5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se cambiaba el medio por DMEM o MEM con 10% de suero fetal bovino. Las células transfectadas se subcultivaban en el soporte adecuado, según su posterior uso, 24 horas tras la transfección, siendo utilizadas 48 ó 72 horas después de la misma. La transfección conjunta de dos ADNs (co-transfección) se llevaba a cabo con el mismo abordaje que la transfección de un único ADN, manteniendo constante los  $\mu\text{g}$  de ADN total adecuados para el soporte a usar.

### III.4 ELECTROFORESIS E INMUNODETECCIÓN

Las muestras se separaban según su masa molecular por electroforesis realizada en minigeles (Sistema de electroforesis MiniProtean3, BioRad) de poliacrilamida (7,5% acrilamida y 0,2% de bisacrilamida) y SDS al 10% en condiciones reductoras (Laemmli, 1970). Las muestras aplicadas en minigeles se sometieron durante 3 h a una corriente constante de 25 mV en tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, glicina 192 mM, SDS al 0.1%). Tras la electroforesis las proteínas

se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore), previamente incubada en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, 15% metanol y 0.037% SDS), mediante un sistema de electrotransferencia semi-seca (Life-Technologies) a 1.2 mA/cm<sup>2</sup> durante 35 minutos en un tampón de transferencia. La unión inespecífica de proteínas se eliminó incubando los filtros con tampón de bloqueo (leche desnatada en polvo al 5% en NaCl 150 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7.4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C toda la noche con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en tampón de bloqueo. Posteriormente, las membranas se lavaron varias veces y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido 1:6000 en tampón de bloqueo (anti-IgG de conejo, cobaya o ratón) unido a peroxidasa. Las bandas se visualizaron con el reactivo de quimioluminiscencia ECL (Amersham Bioscience). Las exposiciones se realizaron en placas de autorradiografía (Afga Curix RP2) y se analizaron densitométricamente.

### III.5 TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA EN CÉLULAS EN CULTIVO

Células MDCK, cultivadas sobre cubreobjetos en placas de 24 pocillos, se transfectaron con los vectores de expresión para las proteínas de interés. 48 horas tras la transfección, las células se lavaron en PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) y se fijaron con 4% PFA en PBS durante 20 minutos. Tras un segundo lavado con PBS, las células se bloquearon y permeabilizaron con 10% de suero fetal de ternera (FCS) y 0.02% de digitonina en PBS durante una hora. A continuación, las células se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido en PBS con 0.1% FCS. Tras 3 lavados, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo (Alexa 488, Alexa 555, Alexa 594 o Alexa 647) en PBS con 0.1% FCS. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, las células se lavaron tres veces con PBS y se montaron con Vectashield (Vector, Burlingame, CA, U.S.A.) sobre un porta objetos para su observación en un microscopio Axioscop2 (Carl Zeiss) acoplado a un equipo confocal Microradiance (BioRad). En todos los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron paralelamente controles con las células no transfectadas, con las células transfectadas sin permeabilizar y con las células transfectadas omitiendo el primer anticuerpo.

### III.6 ENSAYO DE TRANSPORTE DE GLICINA EN CÉLULAS EN CULTIVO

Células COS7 o MDCK se cultivaron en placas de 24 pocillos y se transfectaron por triplicado para cada condición experimental con los vectores de expresión para las proteínas de interés. Los ensayos de transporte se realizaron 48 horas después de la transfección en un baño con agitación constante a 37°C. Tras eliminar el medio de cultivo, las células se lavaron con PBS 100 mM glucosa y se incubaron durante 10 minutos con 300 µl de medio de transporte (0.05 µM [2-<sup>3</sup>H]-glicina (1.6 TBq/mmol; PerkinElmer Life Sciences) diluida en PBS 100 mM glucosa). Para detener el transporte de glicina, las células se lavaron tres veces con PBS 100 mM glucosa y se lisaron con 250 µl de NaOH 0.2 N. Tras 24 horas a 4°C con NaOH, se tomaron 10 µl de cada pocillo para la determinar la concentración de proteínas mediante un ensayo de Bradford (BioRad), y 100 µl para

determinar la cantidad de [2-<sup>3</sup>H]-glicina transportada en el contador de centelleo líquido (LKB 1219 Rackbeta). La determinación de la actividad del transportador, expresada en nmoles de glicina transportada/mg proteína, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Cpm} \times 0.5 \times \text{vol prot} / \text{mg prot} \times \text{vol contaje} \times \text{STD}$$

- ▶ Cpm: cuentas por minuto de la muestra.
- ▶ Vol prot: volumen de muestra utilizado para medir proteínas.
- ▶ Vol contaje: volumen de muestra utilizado para determinar las cuentas en el contador de centelleo líquido.
- ▶ mg prot: mg de proteínas de la muestra determinados en el ensayo de Bradford.
- ▶ STD: cuentas por minuto de 10 µl de medio de transporte.

A cada actividad medida se le resta la actividad obtenida por células transfectadas con el vector de expresión pCDNA3 vacío.

### III.7 MARCAJE DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA POR BIOTINILACIÓN

Células COS-7 o MDCK se cultivaron en placas de 6 pocillos y se transfectaron con los vectores de expresión para las proteínas de interés. 48 horas tras la transfección, las células se lavaron con PBS completo (PBS, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> y 1 mM MgCl<sub>2</sub>) a 4°C. Tras 15 minutos a 4°C en PBS completo (PBSc), las células se incubaron con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml (Pierce) en PBSc durante 20 minutos a 4°C. Tras la incubación, las células se lavaron con L-lisina 100 mM en PBSc durante 40 minutos a 4°C para bloquear la biotina que no hubiera reaccionado. A continuación, las células se lisaron con tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 2mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40 y 0.5% deoxicolato sódico) durante 30 minutos a 4°C. Parte del lisado se reservó para su análisis mediante electroforesis e inmunodetección y el resto del lisado se incubó con 50 µl de una matriz de estreptavidina-agarosa durante 2 h a temperatura ambiente con agitación rotatoria. La matriz de agarosa se sedimentó por centrifugación y se lavó cinco veces con el tampón de lisis. Las proteínas unidas a la estreptavidina-agarosa se eluyeron con tampón de carga Laemmli (0.065 M Tris, 10% glicerol, 2.3% SDS, 100 mM DTT, 0.01% azul de bromofenol) durante 10 minutos a 95°C. Finalmente, las muestras se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección.

### III.8 AISLAMIENTO DE SINAPTOSOMAS

El cerebro de una rata adulta, sacrificada por decapitación, se homogeneizó mecánicamente con un Potter en una solución de sacarosa 0.32M y se centrifugó durante 2 minutos a 5000 rpm



en el rotor SS-34 de una centrífuga SORVALL. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 11000 rpm durante 12 minutos a 4°C y el precipitado obtenido (P2) se resuspendió en la solución de sacarosa. El P2 se depositó sobre un gradiente de Percoll (5-15-25%) y, tras una centrifugación de 15 minutos a 12000 rpm, la banda sinaptosomal, situada entre los porcentajes 15 y 25 de Percoll, se aisló y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos. Finalmente, el precipitado se lavó y se resuspendió en medio HBM (0.14 M NaCl, 5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucosa y 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4) a una concentración de 10 mg/ml (Nagy et al., 1984) .

### III.9 SOLUBILIZACIÓN Y RECONSTITUCIÓN DE GLYT1 EN PROTEOLIPOSOMAS

Células COS-7 crecidas en placas de 100 mm de diámetro fueron transfectadas con los vectores de expresión para GLYT1 y los distintos mutantes. 48 horas tras la transfección, las células se levantaron de la placa, se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en PBS, ajustando la concentración de proteínas a 5 mg/ml. Las células se solubilizaron en colato sódico al 20% en una relación 1:1 mg de detergente/mg de proteína. Después de 10 minutos en hielo, las proteínas se reconstituyeron mediante la adición de liposomas. Tras 20 minutos de incubación a 4°C, los proteoliposomas reconstituidos se añadieron a una columna de Sephadex G-50 y se recolectaron por centrifugación.

### III.10 TRANSPORTE DE GLICINA EN SINAPTOSOMAS Y PROTEOLIPOSOMAS RECONSTITUIDOS

Los sinaptosomas o proteoliposomas reconstituidos se diluyeron hasta una concentración de proteínas de 2 mg/ml. 20 µl de estas preparaciones se incubaron por triplicado con el medio radiactivo (2-<sup>3</sup>H glicina 0.05 µM, CaCl<sub>2</sub> 1 µM en PBS) durante diez minutos a 37°C. Tras la incubación, las muestras se fijaron por succión a una membrana de nitrocelulosa de 2 cm<sup>2</sup> y se lavaron tres veces con PBS frío. A continuación, se determinó la cantidad de 2-<sup>3</sup>H glicina contenida en la membranas en el contador de centelleo líquido (LKB 1219 Rackbeta). En estos experimentos, la cantidad de glicina transportada se estimaba sustrayendo a las cpm obtenidas en las muestras problema, las cpm obtenidas en un control en el que se incubaban las muestras con el medio radiactivo a 4°C.

### III.11 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Para la purificación de las proteínas de fusión utilizadas para los ensayos de *pull down* se transformaron cultivos bacterianos de *E. Coli* BL21 (servicio de fermentación CBMSO) con construcciones del extremo carboxilo terminal de GLYT1 en el vector de expresión bacteriano pGEX-5x. La expresión de las proteínas de fusión en el cultivo se indujo con IPTG 1 mM (Boehringer) durante 5 horas a 37°C. Tras la inducción, las bacterias se sedimentaron mediante centrifugación y

se lisaron en tampón de lisis (PBS suplementado con EDTA 10 mM, lisozima 0.2 mg/ml (Boehringer) y PMSF 0.4 mM. Después de una incubación en hielo de 20 minutos, se añadió DT<sup>T</sup> 5 mM y Tritón X-100 al 0.1%, y el lisado se incubó en hielo nuevamente durante 10 minutos. Tras esta incubación, el lisado se sonicó y centrifugó a 7800 g durante 15 minutos. El sobrenadante, que contenía la proteína de fusión, se añadió a una columna de glutation-Sefarosa (Pharmacia) equilibrada con PBS. Posteriormente, la columna se lavó con 10 volúmenes de PBS. Y finalmente, la proteína de fusión se eluyó con tampón 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM glutation (Sigma). La purificación de GST control se realizó de forma análoga partiendo de bacterias transformadas con el vector pGEX-2 sin inserto.

### III.12 ENSAYO DE “PULL DOWN”

Células COS-7 crecidas en una placa de 100 mm se transfectaron con el vector de expresión para la construcción Myc-Sec24D. 48 horas tras la transfección, las células se solubilizaron en tampón de lisis RIPA durante 30 minutos a 4°C. El material solubilizado, obtenido tras una centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos, se pre-incubó con 100 µl de una matriz de glutation-sefarosa (GE Healthcare) al 50% (v/v) durante 1 hora con rotación en la noria a 4°C. Tras una centrifugación, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó con GST sola o con la proteína de fusión con GST adecuada durante toda la noche con rotación constante a 4°C. Posteriormente, la matriz se lavó cinco veces con RIPA frío y se le añadió 25 µl de tampón de carga Laemmli. Las muestras se calentaron a 92°C durante 3 minutos y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección.

### III.13 ENSAYO DE ENTRECruzAMIENTO QUÍMICO Y CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE SACAROSA

Para los ensayos de entrecruzamiento químico se utilizó 1 mg de sinaptosomas de médula espinal de rata para cada reacción. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con los agentes entrecruzantes DSS (permeable a la membrana plasmática) o BS<sup>3</sup> (impermeable a la membrana plasmática) a una concentración final de 5 mM (ambos compuestos de Pierce). La reacción se detuvo mediante la incubación de los sinaptosomas con 50 mM Tris/HCl pH 7.4 durante 15 min. Las muestras se precipitaron por centrifugación 1 minuto a 14000 rpm en una microcentrífuga y se lisaron durante 1 hora a 4°C en 1 ml de tampón de lisis RIPA (150 mM NaCl, 2mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.3% SDS, 1% N0nidet P-40 y 0.5% deoxicolato sódico). Los lisados se centrifugaron a 100000 g 30 minutos para descartar el material insoluble y se depositaron sobre 10 ml de un gradiente continuo (1-15%) de sacarosa apoyado sobre 1 ml de sacarosa al 25%. El gradiente se centrifugó a 28000 rpm durante 16 horas usando un rotor SW40.1 en una ultracentrífuga. Después de la centrifugación, las muestras se recolectaron desde la parte inferior del tubo en fracciones de 0.5 ml. Las proteínas de las fracciones se precipitaron con ácido tricloracético y se resuspendieron en 100 µl de tampón de carga Laemmli. 30 µL de cada fracción se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección.

### III.14 MICROSCOPIA FRET

La eficiencia de FRET entre CyPetm e YPetm (Nguyen et al., 2005), acoplados al extremo carboxilo terminal de Glyt1, fue medida en células COS-7 vivas sobre placas con fondo de cristal, usando el método de emisión sensibilizada, 24-48 horas tras la transfección. Para estos experimentos se utilizó un microscopio de fluorescencia invertido Axiovert 200M (Zeiss) equipado con una rueda con filtros de excitación y emisión ( $\lambda$  10-2; Sutter) y una cámara monocroma Roper Scientific CoolSnap FX. El manejo del equipo y la adquisición de imágenes se llevó a cabo con el programa Metamorph 6.2.6 (universal Imaging). Las imágenes del donador, del aceptor y de FRET fueron tomadas secuencialmente (exposición 200 ms, bin 2) con un objetivo 63X en aceite de inmersión (1.4 NA) usando un espejo policromico (86002v2bs; Croma Technology Corp.), un filtro de excitación (CFP: S430/X 25 e YFP: S500/X 20) y un filtro de emisión (CFP: S470/30 e YFP: S535/30). La eficiencia de FRET fue calculada utilizando el programa Image J y el plug-in Pixfret (Feige et al., 2005). En los experimentos de FRET se utilizaron como controles negativos células cotransfectadas con los plásmidos Cyptem e YPetm y células cotransfectadas con las construcciones CyptemEAAT2 e YptemGlyt1. Como control positivo se utilizaron células transfectadas con el tándem CFP-YFP. Los coeficientes de acoplamiento de fluorescencia (bleed-through) fueron calculados usando pilas de imágenes de FRET/donador o FRET/aceptor capturadas en células que solo expresaban el donador o el aceptor respectivamente. Los coeficientes se promediaron de 20 pilas de imágenes para cada experimento. El Plug-in PixFRET representó pixel por pixel los valores de la eficiencia de FRET (expresados como porcentaje) en las imágenes. Para los cálculos y la evaluación estadística se promediaron los valores de intensidad calculados de las imágenes de la eficiencia de FRET. Para cada experimento se tomaron un mínimo de 40 pilas de imágenes de células diferentes.

### III.15 TRATAMIENTOS CON ACTIVADORES E INHIBIDORES

Las células transfectadas o los sinaptosomas de médula espinal de rata en HBM se incubaron durante los tiempos adecuados, y los medios correspondientes, con los distintos tratamientos en las concentraciones que a continuación se detallan: PMA 1  $\mu$ M (Calbiochem), monensina 10  $\mu$ M (Calbiochem), cicloheximida 50  $\mu$ M (Sigma), filipina 5  $\mu$ g/ml (Sigma), inhibidores de UCH L1 y UCH L3 5  $\mu$ M (Calbiochem). En las muestras no tratadas se utilizó el vehículo correspondiente como control. Todos los reactivos se prepararon en el momento de su uso a partir de soluciones concentradas 1000 veces. Los posibles efectos tóxicos en cultivos celulares se analizaron mediante un ensayo XTT (Sigma). Ningún tratamiento mostró toxicidad en los tiempos y concentraciones usados en los experimentos.

### III.16 ESTUDIOS FUNCIONALES DE ELECTROFISIOLOGÍA

*Obtención de los oocitos:* El sapo *Xenopus laevis* se anestesió con MS222 (tricaina metasulfonato, Sigma) 0.10% (peso/volumen) en agua durante 30 minutos. A continuación, se extrajo una porción del ovario del sapo a través de una incisión en el abdomen. Posteriormente los oocitos se trataron

con colagenasa 1mg/ml (tipo B, Roche) en medio OR-2 (NaCl 82.5 mM, KCl 2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM pH 7.4 y gentamicina 50 µg/ml) durante una hora en agitación para eliminar restos de tejido ovárico y las celular foliculares. Se seleccionaron los oocitos con buena apariencia en estadio V y VI. Un día después de la extracción, se inyectaron 50 ng del ARNc de GLYT1b en 50 nl de agua estéril utilizando un sistema de micro inyección (Drummond). Los oocitos se analizaron 7 días después de la micro inyección.

*Preparación del ARNc de GLYT1b:* El ADNc de GLYT1b se clonó en las dianas Eco RI del plásmido pSP64T. Este vector contiene la 5' y 3' UTR del gen de la globina de *Xenopus laevis* flanqueando el sitio de clonaje, lo cual estabiliza al ARN en el interior del oocito. La transcripción *in vitro* se realizó sobre el vector linearizado con la enzima de restricción Xba I con ARN polimerasa SP6 (Amersham). El ARN obtenido se resuspendió a una concentración de 1 µg/µl y se congeló a -80°C hasta su utilización.

*Registro de corrientes:* Para registrar las corrientes de los oocitos se utilizó el método de fijación del voltaje con dos electrodos (TEVC). Para esta técnica se utilizaron dos capilares de borosilicato con una resistencia de 0.5-1.5 MΩ rellenos de KCl 3M conectados a dos electrodos, uno de corriente y el otro del voltaje. También se utilizó un electrodo de referencia que siempre estaba en contacto con el baño donde se encontraba el oocito. Las células eran bañados por un flujo continuo y constante de una solución tampón con iones Na<sup>+</sup> (Medio Na<sup>+</sup>: NaCl 100mM, Hepes 10mM, MES 10mM, KCl 2mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM). La señal eléctrica registrada se amplificó y filtró a 100 Hz con un amplificador (Axoclamp 900A, Axon) y posteriormente se digitalizó (Digidata 1440A, Axon) para su posterior análisis con el programa de ordenador Clamfit (Axon). Para los experimentos en los que se registró la corriente de manera continua, se fijó el potencial de reposo del oocito a -40 mV y se midió la corriente necesaria para mantener ese potencial cuando se perfundía glicina 1mM en medio Na<sup>+</sup>. Para los experimentos en los que se varió el potencial de membrana, se fijó el potencial de reposo del oocito a -40 mV y se midió la corriente en presencia y ausencia de glicina al aplicar un programa que variaba el potencial de membrana en saltos de -20 mV, desde +50 mV hasta -130 mV (10 saltos).

### III.17 ENSAYO DE ENDOCITOSIS DE GLYT1 ACOPLADO AL DOMINIO EXTRACELULAR DEL RECEPTOR DE NGF

Células MDCK se plaquearon sobre un cubreobjetos en una palca de 24 pocillos y se transfectaron con las distintas construcciones acopladas al dominio extracelular del receptor de NGF (NGFR). Tras 48 horas después de la transfección, las células se marcaron a 4°C durante 30 minutos con el anticuerpo primario contra el dominio extracelular del NGFR diluido en PBS. Tras tres lavados con PBS frío, las células se marcaron con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo alexa 488 durante 30 minutos a 4°C. Después de lavar las muestras con PBS, se fijaron con PFA al 4% durante 10 minutos las células control, mientras que las células problema se incubaron a 37°C durante 30 minutos para permitir que las construcciones se endocitaran. Tras ese tiempo, las células se fijaron con PFA al 4% durante diez minutos. Después de este paso, las muestras podían ser montadas para su observación en el microscopio confocal, o bien realizar una inmunofluorescencia sobre ellas.

### III.18 AISLAMIENTO DE CONJUGADOS GLYT1/HIS-UBIQUITINA

Células MDCK crecidas en placas de 100 mm de diámetro fueron cotransfectadas con los vectores de expresión para GLYT1-YFP/His-Ubiquitina, ó 5K-YFP/His-Ubiquitina. 48 horas tras la transfección, las células se lisaron con 2 ml de tampón de lisis (6M Guanidinium-HCl, 0.1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0, 5mM imidazol) y se sonicaron durante 2 min. Los lisados se incubaron con 70  $\mu\text{l}$  de una matriz de agarosa  $\text{Ni}^{2+}$ -ácido nitroacético durante 4 horas a temperatura ambiente en agitación rotatoria. La matriz de agarosa se precipitó por centrifugación a 14000 rpm durante un minuto y se sometió a los siguientes lavados: 1) 340  $\mu\text{l}$  de 6M Guanidinium-HCl, 0.1M fosfato sódico pH 8.0; 2) 700  $\mu\text{l}$  de 6M Guanidinium-HCl, 0.1M fosfato sódico pH 5.8; 3) 340  $\mu\text{l}$  de 6M Guanidinium-HCl, 0.1M fosfato sódico pH 8.0; 4) 700  $\mu\text{l}$  1:1 de 6M Guanidinium-HCl, 0.1M fosfato sódico pH 8.0, 100mM KCl, 20% glicerol, 0.2% Nonidet P-40; 5) 700  $\mu\text{l}$  1:3 de 6M Guanidinium-HCl, 0.1M fosfato sódico pH 8.0, 100mM KCl, 20% glicerol, 0.2% Nonidet P-40; 6) 700  $\mu\text{l}$  de 50mM fosfato sódico, 100 mM KCl, 20% glicerol, 0.2% Nonidet P-40; 7) 700  $\mu\text{l}$  de 50mM fosfato sódico, 100 mM KCl, 20% glicerol, 0.2% Nonidet P-40, 10 mM imidazol. Finalmente las proteínas se eluyeron con 30  $\mu\text{l}$  del último tampón de lavado mas 500 mM imidazol (50mM fosfato sódico, 100 mM KCl, 20% glicerol, 0.2% Nonidet P-40, 500 mM imidazol), se les añadió tampón de carga Laemmli y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida e inmunodetección.

### III.19 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

- CLUSTALW: Programa que contiene una base de datos que permite comparar múltiples secuencias de DNA o de proteína y muestra el mejor alineamiento posible entre ellas. Además, indica los residuos conservados, el grado de conservación de los mismos y permite la construcción de árboles filogenéticos.

Acceso en la dirección: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>

- MEDLINE Entrez: Es una base de datos de publicaciones que pertenece a la *Nacional Library of Medicine* (NLM). Dispone de información bibliográfica de biomedicina.

Acceso en la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/entrez/query.fcgi>

- BLAST (*Basic Local Alignment Tools*): Programa que encuentra en las bases de datos secuencias de proteínas y DNA. Permite identificar una secuencia dada con las secuencias de la base de datos y muestra una lista de los alineamientos más satisfactorios.

Acceso desde la dirección: <http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.



## IV. RESULTADOS

---



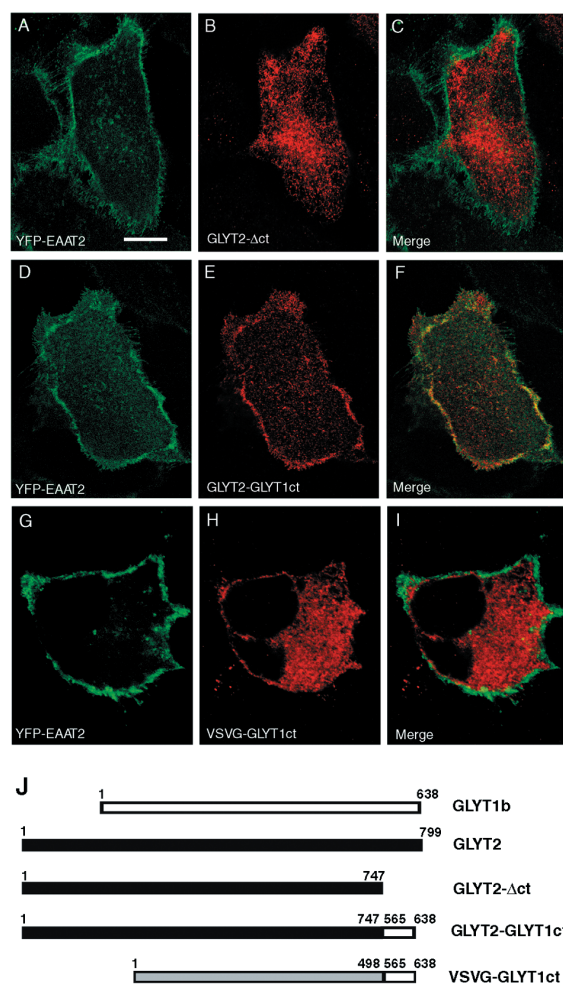


## IV.1 TRÁFICO DE GLYT1 HACIA LA MEMBRANA PLASMÁTICA

### IV.1.1 El extremo carboxilo terminal de GLYT1 tiene señales de exportación del retículo endoplasmático

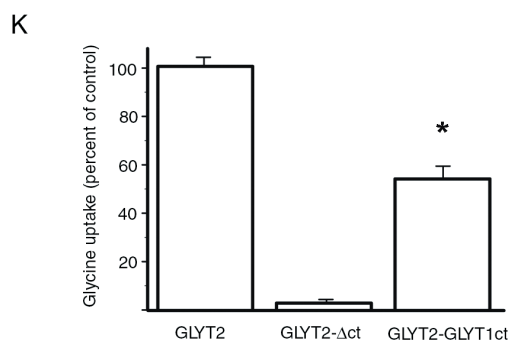
Estudios previos en mutantes de GLYT1 truncados en el extremo carboxilo terminal habían revelado la importancia de estos aminoácidos en el tráfico intracelular del transportador (Olivares et al., 1994). En esas investigaciones se detallaba como estas formas truncadas de la proteína quedaban retenidas en el retículo y no alcanzaban la membrana plasmática. A partir de esos resultados, se decidió investigar la posible existencia en el extremo carboxilo terminal de GLYT1 de una señal autónoma de exportación del retículo endoplasmático capaz de promover la salida del transportador, así como la salida de otras proteínas retenidas en este compartimento intracelular. Para realizar este ensayo se elaboró una construcción en la que se trasplantaron los aminoácidos del extremo carboxilo terminal de GLYT1 comprendidos entre las posiciones 555 y 638 (GLYT1ct) a un mutante truncado en el extremo carboxilo terminal del transportador de glicina GLYT2 (GLYT2- $\Delta$ ct), perteneciente a la misma familia génica, formando así la proteína quimérica GLYT2-GLYT1ct (Fig. 9J). La expresión de las diversas construcciones se ensayó mediante inmunofluorescencias en la línea celular MDCK, unas células que exportan eficientemente las proteínas de membrana sobrepresadas en las mismas. En un experimento en el que se utilizó como control del tráfico intracelular y marcador de membrana plasmática el transportador de glutamato EAAT2 acoplado a YFP, se comprobó que GLYT2- $\Delta$ ct se comportaba igual que los mutantes de delección de GLYT1, quedando retenido en compartimentos intracelulares (Fig. 9, A-C). Sin embargo, la presencia del extremo carboxilo terminal de GLYT1 en la quimera GLYT2-GLYT1ct promovió la llegada de la quimera a la membrana plasmática, localizándose junto al marcador YFP-EAAT2 (Fig. 9, D-F). Por

el contrario, la unión de GLYT1ct a una forma truncada de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular no fue capaz de sustituir a la señal de exportación del retículo endoplasmático presente en el extremo carboxilo terminal (aminoácidos 500-511) de la proteína vírica (Fig. 9, G-I). Por lo tanto, parecía que la señal de exportación presente en el extremo carboxilo terminal de GLYT1 sólo funcionaba en el contexto de proteínas relacionadas evolutivamente, sugiriendo la existencia de motivos proteicos adicionales implicados en la llegada de los transportadores a la membrana plasmática.



**Figura 9. Localización de las quimeras con el extremo carboxilo terminal de GLYT1b.**

Células MDCK fueron co-transfectadas con YFP-EAAT2 junto a la forma truncada de GLYT2 (GLYT2 $\Delta$ ct) (A-C), la quimera GLYT2-GLYT1ct (D-F), o la quimera VSVG-GLYT1ct (G-I). Después de dos días, las células se fijaron y se marcaron con los anticuerpos contra GLYT2 (A-F) o contra el extremo carboxilo terminal de GLYT1 (G-I). Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m). J. Representación esquemática de las construcciones utilizadas para este experimento. Los números indican el aminoácido inicial y final de los segmentos trasplantados en función de su numeración en la proteína nativa. K. Células COS-7 fueron transfectadas con las construcciones indicadas en la figura. Después de dos días, se analizó el transporte de [ $^3$ H]glicina durante 10 minutos de las construcciones transfectadas. Los datos indican el porcentaje de [ $^3$ H]glicina transportada respecto a los controles y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los datos de la construcción GLYT2-GLYT1ct fueron comparados con los datos de la construcción GLYT2- $\Delta$ ct usando el test t de Student. \* $P < 0.001$ .



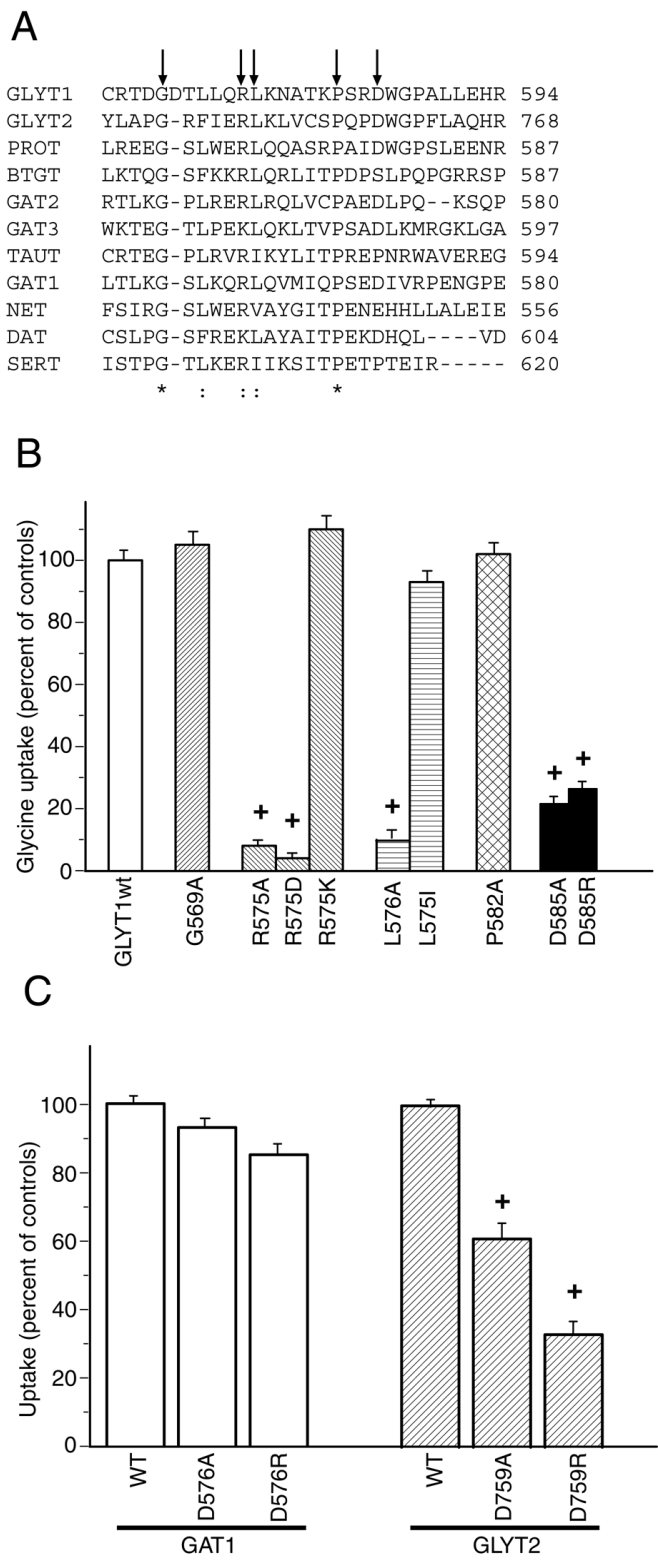
Para cuantificar el porcentaje de proteína quimérica que alcanzó la membrana plasmática se llevo a cabo un experimento de transporte de [ $^3$ H]glicina en células COS-7. En este ensayo, el mutante de delección GLYT2- $\Delta$ ct transportó sólo un 2% de la [ $^3$ H]glicina transportada por el GLYT2 nativo (GLYT2wt), mientras que la capacidad de transporte de GLYT2-GLYT1ct fue de un 53% del valor medido para GLYT2wt. Este hecho confirmaba que la presencia del extremo carboxilo terminal de GLYT1 era capaz de promover significativamente la llegada a la membrana plasmática de una proteína relacionada evolutivamente que estaba retenida en el interior celular (Fig. 9K).

Debido a que la señal de exportación del retículo endoplasmático de GLYT1 sólo funcionó en el contexto de una proteína relacionada evolutivamente, se comprobó mediante un alineamiento múltiple qué aminoácidos estaban conservados en el extremo carboxilo terminal de los diferentes miembros de la familia de transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio y cloruro (Familia SLC6) (Fig. 10A). Mediante esta herramienta bioinformática se observó que sólo cinco aminoácidos estaban conservados en esa región: Glicina<sup>569</sup>, Leucina<sup>572</sup>, Arginina<sup>575</sup>, Leucina<sup>576</sup> y Prolina<sup>582</sup>. Igualmente, el Aspartato<sup>585</sup> estaba muy conservado, aunque en menor proporción que los anteriores. Usando técnicas de mutagénesis dirigida se reemplazaron los aminoácidos de las posiciones conservadas, bien por alaninas, o bien por los aminoácidos adecuados para generar mutaciones conservadoras y no conservadoras. Posteriormente, la funcionalidad de los mutantes generados fue analizada por ensayos de transporte de [ $^3$ H]glicina. En estos experimentos se vio que los mutantes G569A y P582A transportaron [ $^3$ H]glicina a niveles similares a los de GLYT1 nativo, al igual que las mutaciones conservadoras de los aminoácidos Arg<sup>575</sup> y Leu<sup>576</sup>. Sin embargo, las sustituciones no conservadoras de estos aminoácidos (R575A, R575D y L576A) produjeron unos mutantes incapaces de transportar [ $^3$ H]glicina. En el Asp<sup>585</sup> la mutación a alanina redujo un 80% la actividad del transportador, y la mutación a arginina un 75%, siempre en comparación con el transportador nativo GLYT1wt (Fig. 10B). El hecho de que los mutantes G569A y P582A tuvieran una actividad similar a GLYT1wt sugería que estos dos aminoácidos no eran esenciales para la expresión en membrana del transportador, mientras que los aminoácidos conservados en la familia SLC6 Arg<sup>575</sup>, Leu<sup>576</sup>, y en cierta medida Asp<sup>585</sup>, eran fundamentales para el tráfico intracelular de los transportadores a la membrana plasmática.

En el tráfico intracelular de los transportadores de la familia génica *SLC6* la importancia del Asp<sup>585</sup> dentro del motivo R<sup>575</sup>L<sup>576</sup> era novedosa. Debido a ello se mutaron a alanina y a aminoácidos no conservados los residuos equivalentes en GAT1 (Asp<sup>576</sup>) y GLYT2 (Asp<sup>759</sup>), para comprobar si en estos transportadores esta posición también era relevante en la exportación de la proteína a la superficie celular. Las mutaciones en la Asp<sup>576</sup> de GAT1 tuvieron escaso efecto en el transporte de GABA. Sin embargo, las sustituciones en la Asp<sup>759</sup> de GLYT2 produjeron unos mutantes con un 39% (GLYT2-D579A) y un 67% (GLYT2-D579R) menos de actividad respectivamente. (Fig. 10C).

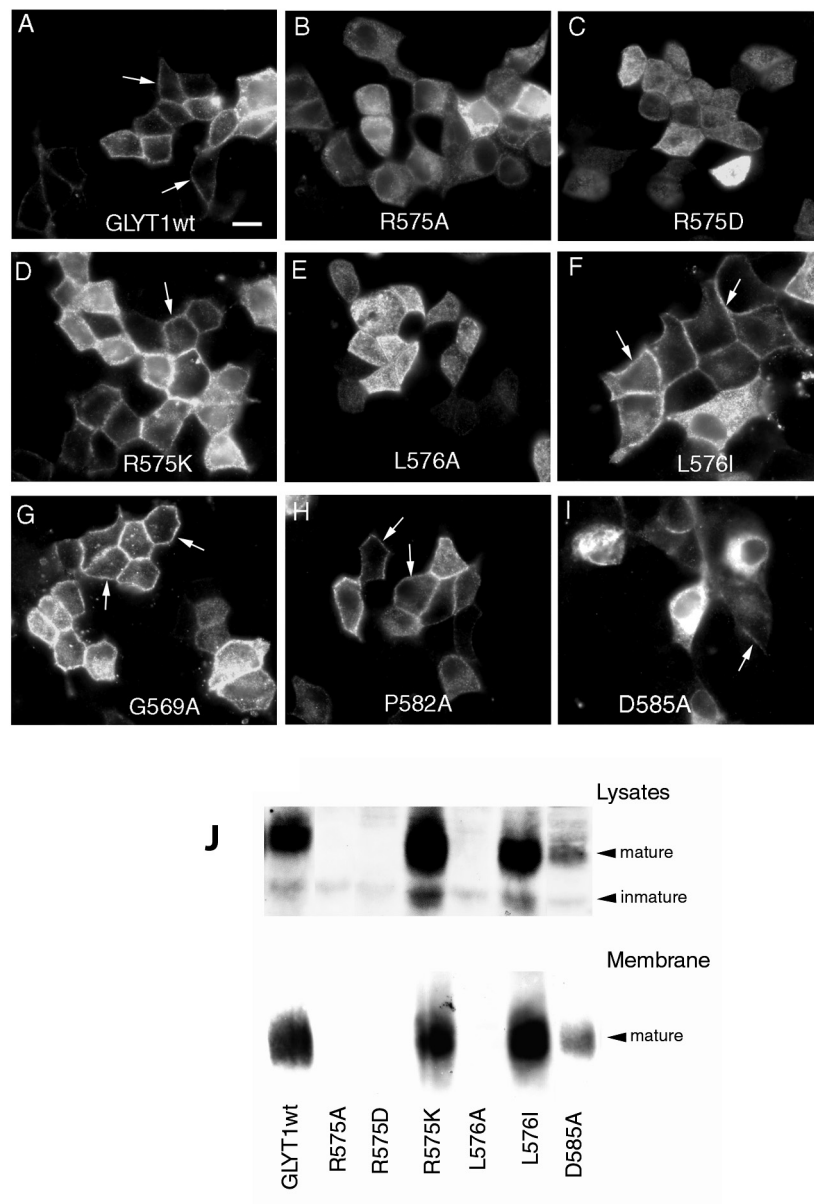
El motivo por el cual algunos de los mutantes generados eran inactivos podría estar relacionado con su localización subcelular. En experimentos de inmunofluorescencia en células MDCK se observó que los mutantes inactivos R575A, R575D y L576A estaban retenidos en compartimentos intracelulares, mientras que los mutantes activos R575K, L576I, G569A y P582A estaban localizados principalmente en la membrana plasmática con un patrón de distribución semejante a GLYT1 nativo. Aunque el mutante D585A estaba retenido principalmente en el interior celular, se observó que en algunas células alcanzaba parcialmente la membrana plasmática. Estos datos estaban en consonancia con los ensayos de transporte de [ $^3$ H]glicina, indicando que la razón por la que los mutantes inactivos

no transportaban [<sup>3</sup>H]glicina era su retención en el interior celular (Fig. 11, A-I).



**Figura 10. Transporte de [<sup>3</sup>H] glicina de mutantes del extremo carboxilo terminal de GLYT1b.**

A. Alineamiento múltiple de los extremos carboxilos de miembros de la familia SLC6 usando un algoritmo de ClustalW. Las abreviaturas son GLYT1-2, transportadores de glicina 1-2; PROT, transportador de Prolina; BTGT, transportador de betaina; GAT1-3, transportadores de GABA 1-3; NET, transportador de norepinefrina; DAT, transportador de dopamina; SERT, transportador de serotonina. Los residuos idénticos o conservados se indican con los símbolos \* o : respectivamente. Los aminoácidos mutados en este estudio se señalan con flechas. B-C. Células COS-7 fueron transfectadas con los distintos mutantes del extremo carboxilo terminal de GLYT1 generados (B) o con los mutantes de GLYT2 o GAT1 (C). Después de dos días se analizó la cantidad de [<sup>3</sup>H]glicina o [<sup>3</sup>H]GABA transportado durante 10 minutos a 37°C. Los datos indican el porcentaje de [<sup>3</sup>H]glicina transportada respecto a los controles y representan la media de tres experimentos por triplicado ± S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. + P<0.001.



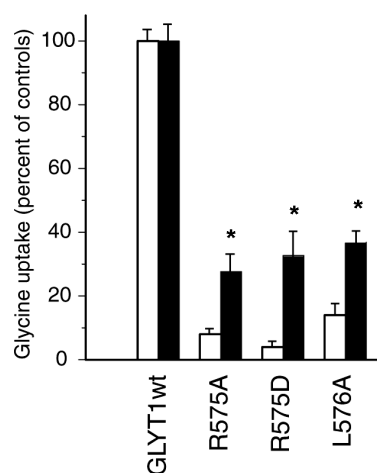
**Figura 11. Localización de GLYT1b y los mutantes del extremo carboxilo terminal del transportador en células MDCK.**

A-I. Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b o los distintos mutantes generados del extremo carboxilo terminal del transportador. Dos días después, las células se fijaron y se marcaron con un anticuerpo contra GLYT1. Las células se visualizaron en un microscopio de fluorescencia y las imágenes se tomaron con una cámara CCD. Las flechas señalan la membrana plasmática en las imágenes correspondientes a GLYT1b nativo, a los mutantes R575K, L576I, G569A, P582A y parcialmente al mutante D585A. (Barra de escala 15  $\mu$ m). J. Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b o los distintos mutantes generados del extremo carboxilo terminal del transportador. Dos días más tarde, las células fueron biotiniladas con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml en PBSc durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas marcadas se recuperaron con una matriz de estreptavidina agarosa para ser analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección usando un anticuerpo contra GLYT1. El panel superior muestra los lisados de las células. En ellos se indica la forma madura e inmadura del transportador. En el panel inferior se muestra la proteína en la membrana plasmática de las células.



Estos resultados también fueron confirmados mediante ensayos de biotilación con el reactivo Sulfo-NHS-Biotina. Esta técnica resultó una herramienta muy útil para el marcaje selectivo de proteínas que se expresan en la superficie celular ya que la membrana plasmática es impermeable a la Sulfo-NHS-Biotina. Este reactivo forma enlaces tipo amida con las lisinas expuestas al medio extracelular, por lo que en este tipo de ensayo sólo se marcan los transportadores que alcanzan la membrana plasmática. En estos experimentos, células MDCK transfectadas con GLYT1 nativo o con los distintos mutantes se incubaron con el reactivo. Posteriormente, las proteínas biotiniladas se recuperaron mediante la incubación del lisado celular con una matriz de estreptavidina-agarosa y se analizaron por inmunodetección. La alta afinidad de la biotina por la avidina permitió separar las proteínas integrales de membrana biotiniladas de aquellas residentes en el citoplasma o en compartimentos subcelulares que no habían resultado marcadas por el reactivo. De esta forma, se pudo confirmar que los mutantes inactivos R575A, R575D y L576A no alcanzaban la membrana plasmática ya que no fueron accesibles a la biotilación. Sin embargo, los mutantes activos fueron biotinilados de manera similar a GLYT1 nativo. En consonancia con los ensayos de transporte y la inmunofluorescencia, el mutante D585A fue parcialmente biotinilado confirmando que un bajo porcentaje del transportador alcanza la membrana plasmática. En los lisados celulares de los mutantes inactivos sólo se detectó la forma inmadura del transportador. Esta forma migra más rápido que la proteína madura debido a que no ha sido glicosilada todavía y corresponde al transportador que está en el retículo endoplasmático. Por el contrario, en los lisados celulares de GLYT1 nativo y en los lisados celulares del resto de mutantes se detectó tanto la forma inmadura como la forma del transportador correspondiente a la proteína madura glicosilada (Fig. 11J).

Para descartar la posibilidad de que un plegamiento incorrecto fuera la causa de que los mutantes inactivos se quedaran retenidos en compartimentos intracelulares y no progresaran hasta la membrana plasmática, se llevó a cabo un experimento de transporte de [ $^3$ H]glicina en proteoliposomas reconstituidos. En esta técnica, las proteínas procedentes de un lisado celular se incorporaban a membranas artificiales constituyendo los proteoliposomas que, posteriormente, se sometían a un ensayo de transporte de [ $^3$ H]glicina. De este modo, aquellas formas de GLYT1 correctamente plegadas pero retenidas en el interior celular podrían ponerse de manifiesto al poder acceder a su sustrato. En este experimento los proteoliposomas fueron reconstituidos a partir de lisados de células COS-7 transfectadas con GLYT1 nativo o con los mutantes inactivos R575A, R575D y L576A (Fig. 12).

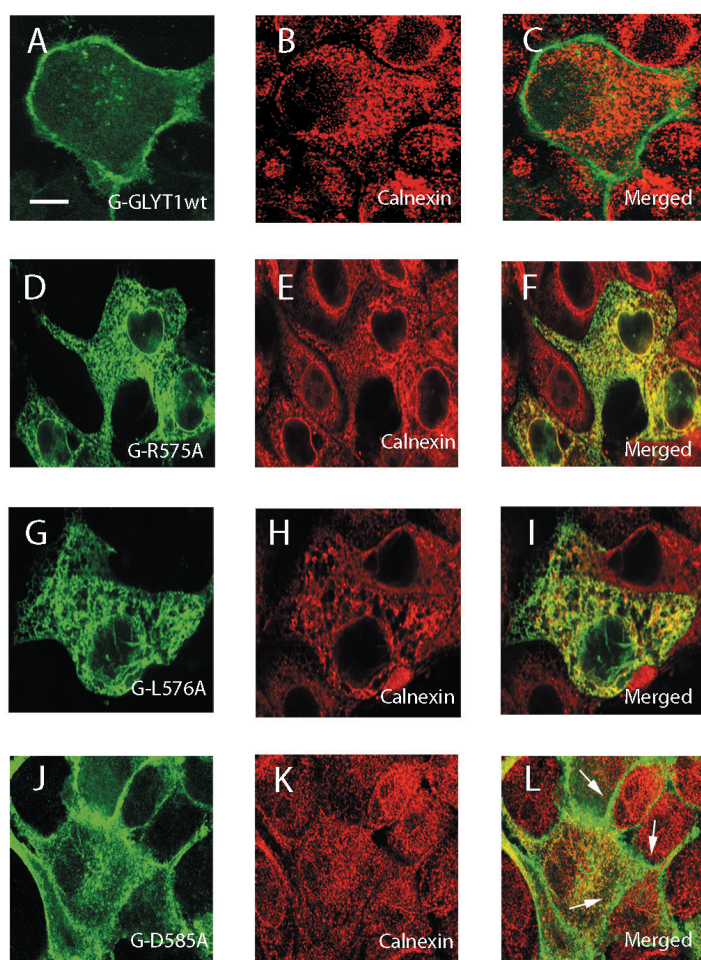


**Figura 12. Actividad de transporte de GLYT1b y los mutantes del extremo carboxilo terminal.**

A. Células COS-7 fueron transfectadas con GLYT1b o los distintos mutantes del extremo carboxilo terminal del transportador indicados en la figura. Dos días después se analizó mediante un ensayo de transporte la cantidad de [ $^3$ H]glicina incorporada durante 10 minutos en las células transfectadas o en los proteoliposomas reconstituidos a partir de ellas. Los datos indican el porcentaje de [ $^3$ H]glicina transportada respecto a los controles y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Las barras blancas representan las células transfectadas y las barras negras representan los proteoliposomas reconstituidos a partir de ellas. Los datos de los proteoliposomas fueron comparados con los de las células usando el test t de Student. \*P<0.001.

En un ensayo de transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina llevado a cabo en células en cultivo intactas, la actividad de los mutantes R575A, R575D y L576A fue de un 5%, un 8% y un 12% respectivamente, en comparación con la actividad de GLYT1 nativo. Sin embargo, cuando estas proteínas se incorporaron a una membrana artificial en proteoliposomas reconstituidos su actividad en un ensayo de transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina fue de un 28%, un 31% y un 35% respectivamente, en comparación con la actividad que presentaban proteoliposomas reconstituidos con GLYT1 nativo (Fig. 12). Los resultados de este experimento ponían de manifiesto que la causa por la cual los mutantes retenidos en el interior celular no progresaban a través de la vía biosintética de la célula no era un plegamiento anómalo, ya que cuando éstos se incorporaban a proteoliposomas reconstituidos y accedían a su sustrato eran capaces de transportar glicina.

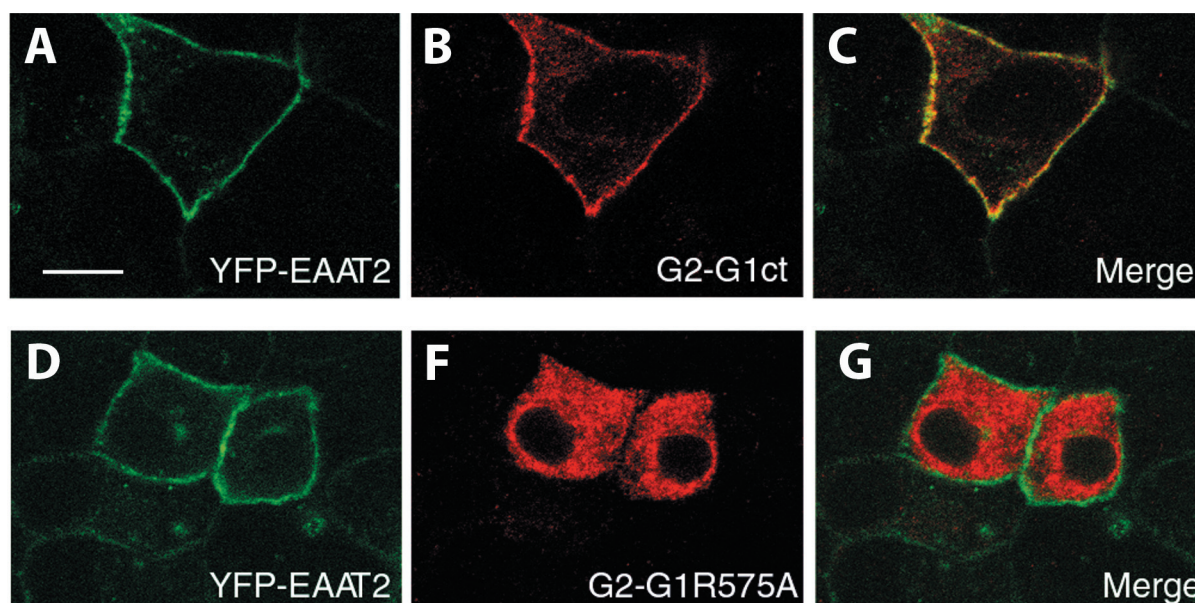
Si los aminoácidos conservados Arg<sup>575</sup>, Leu<sup>576</sup> y Asp<sup>585</sup> constituían una señal de exportación del retículo endoplasmático, una mutación en dicha secuencia tendría como consecuencia un transportador que se quedaría retenido en este compartimento intracelular. Para comprobar si ocurría así se realizó una inmunofluorescencia en células MDCK en la que se utilizó el marcador de retículo endoplasmático calnexina. Como se esperaba, los mutantes inactivos R575A, R575D, L576A y D585A se localizaron de manera precisa junto con la calnexina (Fig. 13, D-L), mientras que GLYT1 nativo se detectó principalmente en la membrana plasmática (Fig. 13, A-C)



**Figura 13. Localización subcelular de GLYT1b y los mutantes del extremo carboxilo terminal del transportador.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b nativo (A-C) o los mutantes R575A (D-F), L576A (G-I) y D585A (J-L). Dos días después las células se fijaron y se marcaron en verde con un anticuerpo contra GLYT1 y en rojo con un anticuerpo contra el marcador de retículo endoplasmático calnexina. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal. El color amarillo en los paneles “Merged” indica una co-localización de los transportadores con la calnexina. (Barra de escala 15  $\mu\text{m}$ ).

Otra prueba de que los aminoácidos conservados en el extremo carboxilo terminal de GLYT1 constituían una señal de exportación del retículo endoplasmático, se obtuvo de un experimento en el que se mutó la Arg<sup>575</sup> en el contexto de la construcción GLYT2-GLYT1ct. En una inmunofluorescencia realizada en células MDCK, la mutación R575A provocó que la proteína quedara retenida en el retículo endoplasmático, mientras que la quimera nativa llegó a la membrana plasmática donde se localizó junto con el marcador YFP-EAAT2 (Fig. 14).

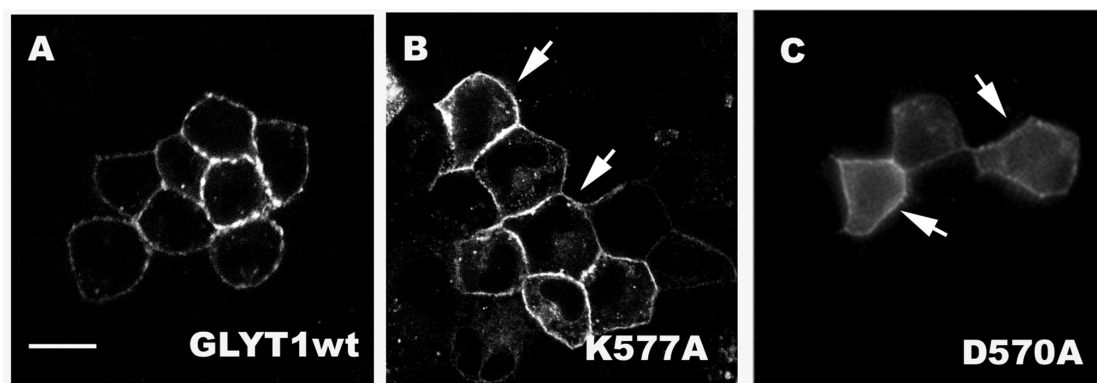


**Figura 14. Localización de la quimera GLYT2-GLYT1R575A.**

Células MDCK fueron co-transfectadas con la construcción YFP-EAAT2 junto a la quimera GLYT2-GLYT1ct (G2-G1ct) (A-C) o junto a la quimera GLYT2-GLYT1R575A (G2-G1R575A). Dos días después, las células se marcaron con un anticuerpo contra GLYT1. Las imágenes fueron tomadas en un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Con estos resultados quedaba confirmada la importancia de la secuencia RL[X<sub>8</sub>]D en la exportación del retículo endoplasmático de GLYT1. Sin embargo, otras señales de exportación descritas para otras proteínas podían ajustarse a secuencias existentes en el extremo carboxilo terminal de GLYT1. Recientemente se había propuesto que el motivo di-básico [RK](X)[RK] estaba involucrado en la exportación de glicosiltransferasas del aparato de Golgi. Dado que el aminoácido 577 de GLYT1 es una lisina, el motivo R<sup>575</sup> L<sup>576</sup> K<sup>577</sup> podría ajustarse a ese tipo de señal. Sin embargo, la mutación a alanina de la Lys<sup>577</sup> resultó en un transportador que alcanzaba la membrana plasmática, al igual que GLYT1 nativo, descartando así la posibilidad de que este residuo estuviera involucrado en la exocitosis de GLYT1 (Fig. 15B). Otra secuencia del extremo carboxilo terminal de transportador que podría ajustarse a un motivo de exportación del retículo endoplasmático di-acídico era la sucesión de aminoácidos D<sup>568</sup> G<sup>569</sup> D<sup>570</sup>, sin embargo, el mutante D570A llegaba con normalidad a la membrana plasmática, indicando que tampoco este residuo estaba implicado en la exportación de GLYT1 (Fig. 15C)





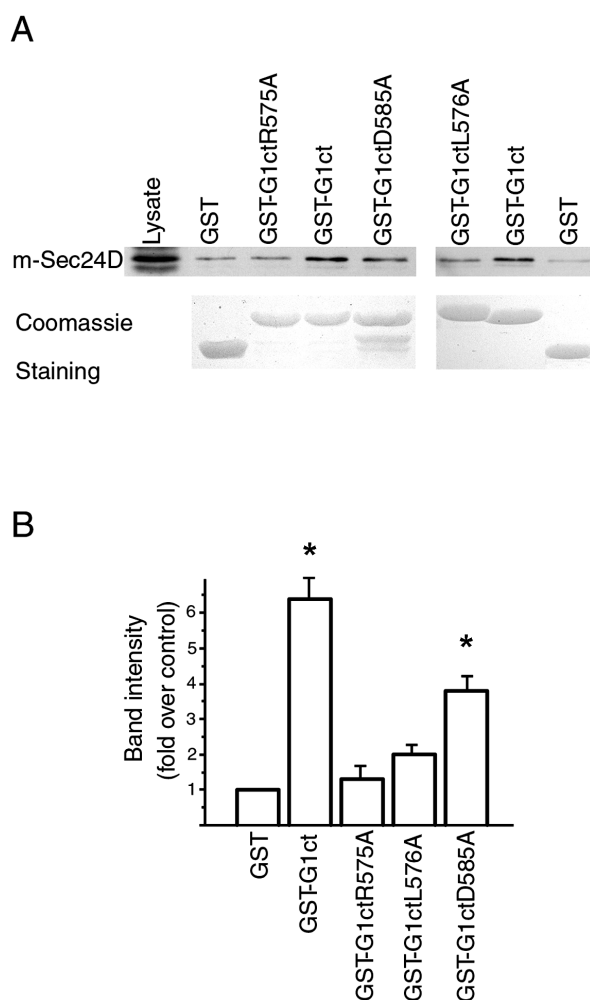
**Figura 15. Localización de los mutantes K577A y D570A en células MDCK.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b nativo (A) o los mutantes K577A (B) y D570A (C). Dos días después las células se fijaron y se marcaron en verde con un anticuerpo contra GLYT1. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Para conocer en profundidad como afectaba la mutación de los aminoácidos Arg<sup>575</sup>, Leu<sup>576</sup> y Asp<sup>585</sup> a la inserción de GLYT1 en la membrana plasmática se decidió comprobar la posible interacción de estos residuos con la maquinaria responsable de la exportación de proteínas del retículo endoplasmático. Los componentes de la cubierta proteica COPII son los responsables del reclutamiento de las proteínas que van a ser exportadas desde el retículo y marcan el lugar de salida de las vesículas exocíticas. El primer paso en el proceso de exportación de proteínas es la unión coordinada de los distintos componentes de la cubierta proteica COPII. Primero la GTPasa Sar1 se ancla a la membrana del retículo, posteriormente se une a ella el complejo Sec23-Sec24 y por último se recluta al complejo Sec13-Sec31, cuya polimerización promueve la formación de la vesícula (Budnik et al., 2009). Los motivos de exportación del retículo endoplasmático conocidos hasta ahora interaccionan con el complejo COPII mayoritariamente a través de su unión a la proteína Sec24. De esta forma, las proteínas que portan estas secuencias específicas de exportación son incluidas en las vesículas de salida y abandonan el retículo endoplasmático para progresar a lo largo de la vía biosintética de la célula.

Para confirmar que la secuencia R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>[X]<sub>3</sub> D<sup>585</sup> de GLYT1 era un motivo de exportación del retículo endoplasmático se realizó un experimento en el que se comprobó la capacidad de unión de estos aminoácidos a Sec24D, una de la 4 isoformas que existen de la proteína Sec24 (Wendeler et al., 2007). De este modo, mediante un experimento de “pull-down” se analizó si unas quimeras compuestas por GST fusionado al extremo carboxilo terminal de GLYT1, nativo o mutado, precipitaban a la proteína Sec24D procedente de un lisado de células COS-7 transfectadas Sec24-myc. Con este ensayo se vio cómo la construcción que llevaba el extremo carboxilo terminal de GLYT1 nativo (GST-G1ct) fue capaz de precipitar Sec24D en mayor cantidad que las construcciones que llevaban mutaciones en las posiciones Arg<sup>575</sup>, Leu<sup>576</sup> y Asp<sup>585</sup> (GST-G1ctR575A, GST-G1ctL576 y GST-G1ctD585A) (Fig. 16A). Mediante un análisis densitométrico de la inmunodetección, se estimó de manera cuantitativa la capacidad de unir Sec24D de las distintas proteínas de fusión. Aunque la construcción GST-G1ctD585A mantenía una capacidad significativa de unión a Sec24D (3.8 veces sobre el control de GST), ésta era claramente menor que la capacidad de unión que presentaba la construcción GST-G1ct (6.4 veces sobre el control.  $P < 0.001$  en test t de Student). Los niveles de unión que presentaban GST-G1ctR575A y GST-G1ctL576 fueron similares al control de GST

solo y su capacidad de unión a Sec24D no fue estadísticamente significativa (0,3 y 1 veces sobre el control respectivamente) (Fig. 16B). Así, mediante estos resultados, se confirmó la aparente participación del motivo RL[X<sub>8</sub>]D en la interacción con Sec24D y por lo tanto en la exportación de la proteína desde el retículo endoplasmático.



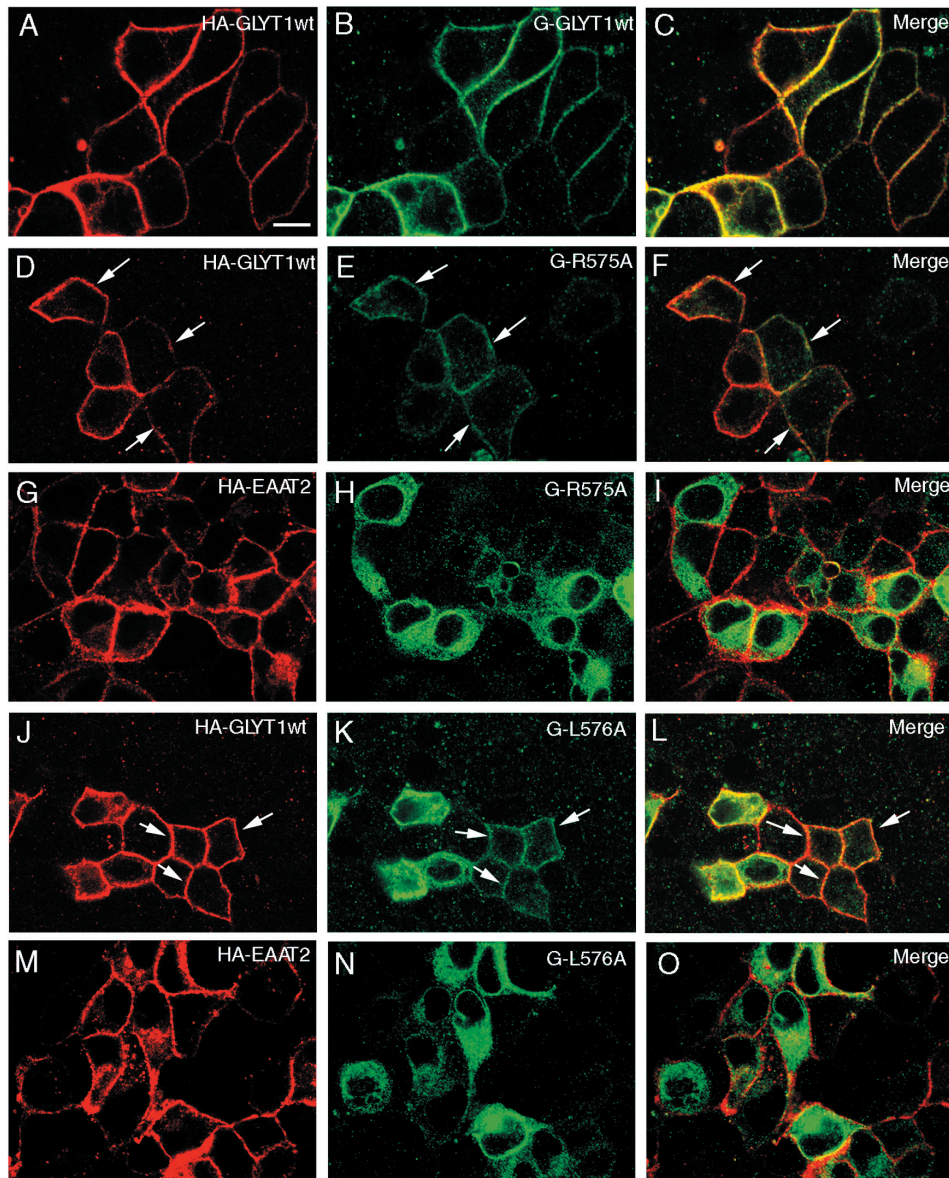
**Figura 16. GLYT1b interacciona con Sec24D.**

A. Células COS-7 fueron transfectadas con la construcción myc-Sec24D. Los lisados de esas células se incubaron con las proteínas de fusión GST (GST), GST-GLYT1ct (GST-G1ct), GST-GLYT1ctR575A (GST-G1ctR575A), GST-GLYT1ctL576A (GST-G1ctL576A) o GST-GLYT1ctD585A (GST-G1ctD585A) unidas a una matriz de glutatión sefarosa. El material unido se eluyó con glutatión y se analizó por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra el epítipo myc. La cantidad de proteína de fusión se analizó con una tinción de Coomassie del gel (panel inferior). B. Las bandas inmunoreactivas para myc se cuantificaron por un análisis densitométrico. Los resultados se representaron indicando el incremento de unión de Sec24D respecto al control obtenido mediante la incubación de los lisados con GST sola. Los valores indican la media de tres experimentos  $\pm$  S.E.M. Los datos de las distintas construcciones fueron comparados con los de GST solo usando el test t de Student. \*P<0.001.

#### IV.1.2 Formación de oligómeros de GLYT1

En un ensayo de inmunofluorescencia se vio que al co-expresar GLYT1 nativo en células MDCK, acoplado al epítipo HA (HA-GLYT1wt), con los transportadores R575A o L576A fusionados a la proteína GFP (G-R575A o G-L576A), un porcentaje de los mutantes alcanzaba la membrana plasmática (Fig. 17, D-F; J-L). Sin embargo, este reclutamiento a la membrana no ocurría si se co-expresaban G-R575A, o G-L576A, con la construcción del transportador de glutamato HA-EAAT2, usada como control negativo (Fig. 17, G-I; M-O). En este caso, los mutantes se quedaban retenidos en el retículo endoplasmático como ya se ha descrito más arriba. El rescate de los mutantes retenidos al coexpresarlos con la forma nativa del transportador sugería la posible formación de oligómeros del transportador a lo largo de la vía biosintética. Aunque estudios previos llevados a cabo en oocitos de *Xenopus* habían descrito que GLYT1 no formaba oligómeros (Lopez-Corcuera

et al., 1993; Horiuchi et al., 2001), la formación de éstos en algunos miembros de la familia SLC6 se ha descrito como un mecanismo de control de calidad en el retículo endoplasmático (Kilic et al., 2000; Sorkina et al., 2003; Just et al., 2004; Schmid et al 2001; Farhan et al., 2006).

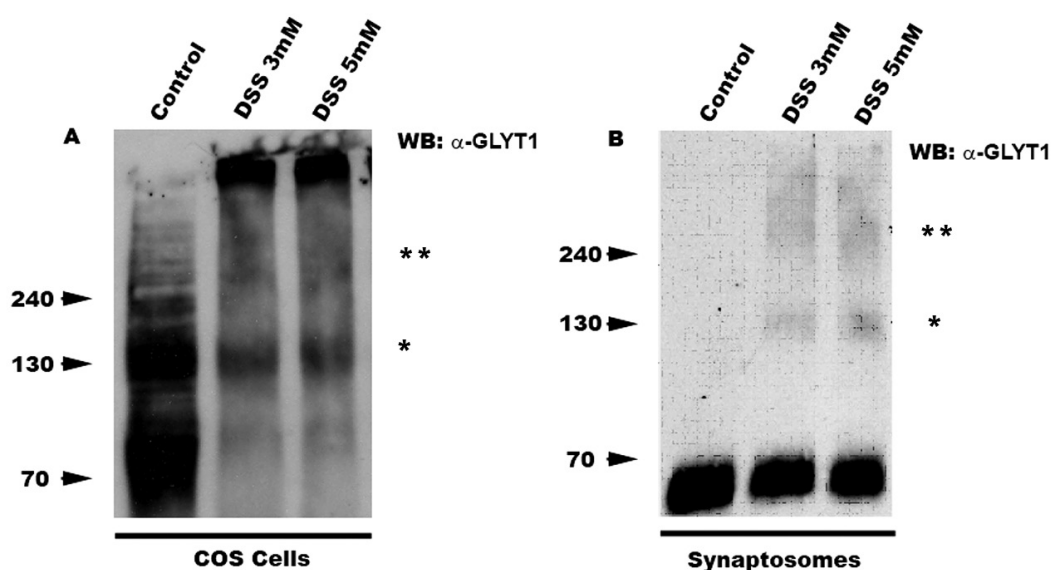


**Figura 17. Co-expresión de GLYT1b y los mutantes del extremo carboxilo terminal del transportador.**

Células MDCK fueron co-transfectadas con la construcción HA-GLYT1 (HA-GLYT1wt) junto a la construcción GFP-GLYT1 (G-GLYT1wt) (A-C), junto a la construcción GFP-GLYT1R575A (G-R575A) (D-F), o junto a la construcción GFP-GLYT1L576A (G-L576A) (J-L). Los controles se realizaron co-expresando las construcciones G-R575A (G-I) o GL576A (M-O) junto a la construcción HA-EAAT2. Dos días más tarde, las células se fijaron y el epítipo HA fue marcado en rojo con los correspondientes anticuerpos. La fluorescencia de las proteínas acopladas a GFP se muestra en verde. Las flechas en los paneles D-F y en los paneles J-L indican la localización en la membrana plasmática junto a GLYT1 nativo de los mutantes retenidos. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).



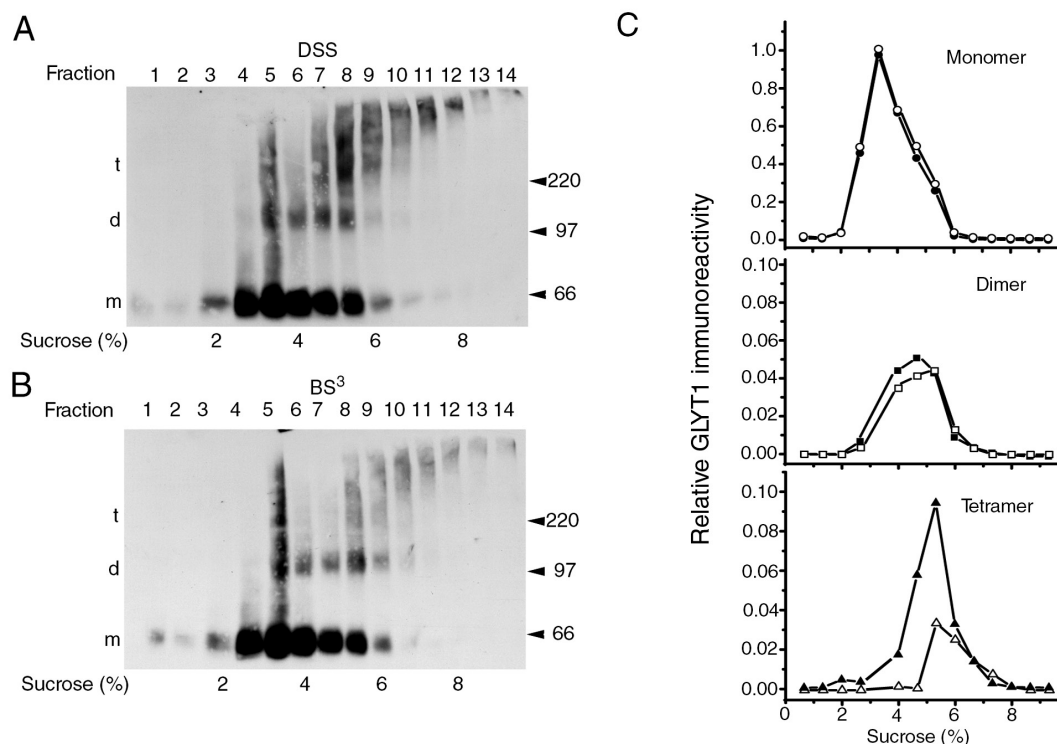
La posible formación de oligómeros de GLYT1 se intentó investigar mediante inmunodetección de lisados de células COS-7 transfectadas. En estos experimentos se utilizó el agente entrecruzante DSS, permeable a la membrana plasmática, para estabilizar los oligómeros y evitar que se disgregaran durante el proceso de la lisis celular. Sin embargo, la tendencia de GLYT1 de formar agregados inespecíficos y de gran tamaño al sobre expresar el transportador en estas células hizo que se desechara este sistema de expresión (Fig. 18A). En su lugar se utilizaron sinaptosomas de médula espinal de rata. En estas muestras, en ausencia de DSS, sólo se detectaba una banda que migraba con el tamaño esperado para el monómero de GLYT1. En cambio, en presencia del agente entrecruzante la cantidad de proteína en forma de monómero disminuía y aparecían bandas que migraban con el tamaño esperado para dímeros y tetrameros del transportador. La disminución de monómeros y la aparición de dímeros y tetrameros era proporcional a la concentración de DSS, siendo 5mM la concentración de agente entrecruzante que se estimó como óptima para poder estudiar de manera precisa los oligómeros de GLYT1 (Fig. 18B).



**Figura 18.** Comparación de la utilización del agente entrecruzante DSS en células transfectadas y en sinaptosomas de médula espinal de rata.

Células COS-7 fueron transfectadas con GLYT1b. Dos días después, se sometieron a un tratamiento con DSS 3 mM o 5 mM. Los lisados de estas células se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra GLYT1. B. Sinaptosomas de médula espinal de rata, obtenidos como se indica en materiales y métodos, se incubaron con DSS en las concentraciones que se indican. Posteriormente, las muestras se analizaron por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra GLYT1. Los símbolos \* y \*\* indican los dímeros y tetrameros de GLYT1 respectivamente.

Una vez desarrollado el sistema en el que poder investigar la posible oligomerización de GLYT1, se llevaron a cabo ensayos para estimar de manera más precisa la cantidad y la forma en la que se encuentra el transportador en muestras de sinaptosomas de médula espinal de rata. Para estos experimentos, aparte del agente entrecruzante DSS, se utilizó su análogo impermeable a la membrana plasmática BS<sup>3</sup> (Staros et al., 1992). Las muestras de sinaptosomas de rata tratadas con estos reactivos se solubilizaron y se sometieron a un proceso de sedimentación en un gradiente de sacarosa. Posteriormente, las fracciones obtenidas del gradiente se analizaron por inmunodetección (Fig. 19, A-B).



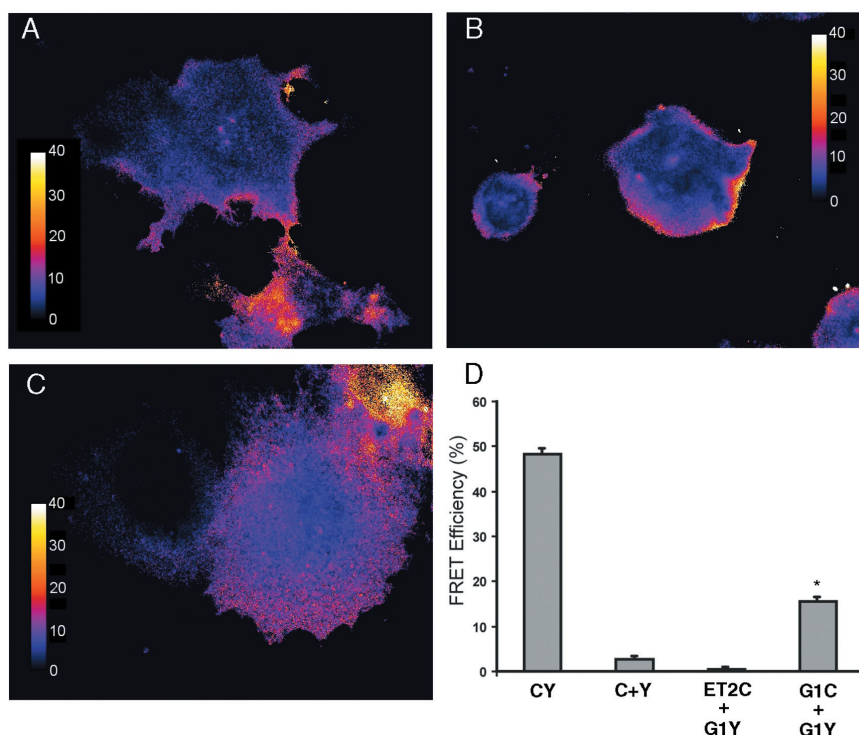
**Figura 19. Análisis de la oligomerización de GLYT1 en sinaptosomas de medula espinal de rata.**

A-B. Sinaptosomas de medula espinal de rata fueron incubados con DSS 5 mM (A) o BS<sup>3</sup> 5 mM (B). A continuación fueron lisados y depositados sobre un gradiente entre 1-15% de sacarosa, con una capa final de 25% de sacarosa. El gradiente se sometió a una centrifugación de 150.000xg durante 16 horas y se recogió en fracciones de 0.5 ml desde la base del tubo. Las proteínas presentes en cada fracción se precipitaron y se analizaron en un gel en gradiente entre el 4-7.5% de acrilamida e inmunodetección con un anticuerpo contra GLYT1. Las fracciones están numeradas desde la parte superior del gradiente. Las letras m, d y t representan los monómeros, dímeros y tetrameros de GLYT1 respectivamente. C. Cuantificación densitométrica de los resultados de la inmunodetección. Los símbolos negros indican la incubación con DSS y los símbolos blancos indican las incubación con BS<sup>3</sup>. Los datos se refieren al valor máximo medido para el monómero. Los valores de cantidad de los dímeros y los tetrameros de GLYT1 son de un orden de magnitud menor que los datos de cantidad de los monómeros. Los valores de la fracción cinco no están incluidos en los gráficos debido a su difícil cuantificación. Monómeros (○), dímeros (□), tetrameros (Δ).

La forma mayoritaria en la que se detectó GLYT1 en las distintas fracciones fue la correspondiente a la de un monómero. En las fracciones con mayor densidad de sacarosa se detectaron formas de un tamaño correspondiente a dímeros y a tetrameros de GLYT1. En el análisis densitométrico de las bandas (Fig. 19C) se vio que el  $88\% \pm 2.3\%$  ( $n=3$ ) de la proteína total tratada con DSS migraba en forma de monómero, mientras que en las muestras tratadas con BS<sup>3</sup>, el monómero representó el  $92.8\% \pm 2.5\%$  ( $n=3$ ). La forma de GLYT1 con la movilidad electroforética correspondiente a un dímero tuvo un pico en la fracción 7 y representó el  $4.9\% \pm 0.4\%$  y el  $4.5\% \pm 0.4\%$  de la proteína total en presencia de DSS y BS<sup>3</sup> respectivamente. La forma de GLYT1 con la movilidad de un tetramero se detectó con más intensidad a partir de la fracción 8. En este caso hubo una diferencia significativa ( $P<0.01$ ) en la cantidad de proteína detectada entre el tratamiento de los sinaptosomas con DSS ( $7.1\% \pm 0.6\%$ ) o con BS<sup>3</sup> ( $2.7\% \pm 0.3$ ). Debido a que con el tratamiento de BS<sup>3</sup> sólo se marcaron las formas de GLYT1 presentes en la superficie de los sinaptosomas, la detec-

ción de una cantidad de tetramero más elevada en presencia de DSS sugería que la mayor parte de la forma tetramérica de GLYT1 se encontraba en compartimentos intracelulares, no accesibles a un reactivo impermeable a la membrana plasmática. A pesar de que los datos obtenidos en estos experimentos eran compatibles con la formación de oligómeros del transportador, no podía descartarse la posibilidad, al haber usado agentes entrecruzantes, de que otras proteínas diferentes al transportador pudieran estar formando parte de los complejos de mayor peso molecular de GLYT1.

Para evitar este problema y detectar los posibles oligómeros de GLYT1 de una manera más precisa y menos invasiva que la utilización de un agente entrecruzante, se realizaron experimentos de microscopia FRET con los fluoróforos especiales CyPetm, o YPetm, acoplados al extremo carboxilo de GLYT1. Para estos ensayos se utilizó el método de FRET de emisión sensibilizada que mide el aumento de fluorescencia del aceptor (YPetm) al excitar al donador (CyPetm). Los valores normalizados y corregidos de FRET (NFRET) se representaron en un diagrama de colores en imágenes de células COS-7 transfectadas con GLYT1-CFP y GLYT1-YFP. Las señales positivas de FRET aparecieron en la membrana de las células y en los compartimentos intracelulares, indicando que GLYT1 está formando oligómeros a lo largo de la vía biosintética (Fig. 20, A-C).



**Figura 20. Microscopia FRET en células transfectadas.**

Células COS-7 fueron co-transfectadas con las construcciones GLYT1YPtem y GLYT1CyPtem. Dos días después la emisión de fluorescencia del donador y del aceptor fue captada de células vivas. La eficiencia de FRET se calculó como se indica en materiales y métodos, y se expresa en un diagrama de colores en imágenes representativas (A-C). D. Histograma que representa los valores de eficiencia de FRET en células COS-7 transfectadas con el tándem CFP-YFP (CY) (control positivo), con CyPetm + YPetm (C+Y) (control negativo 1), con EAAT2CyPtem + GLYT1YPtem (ET2C+G1Y) (control negativo 2) o con GLYT1YPtem + GLYT1CyPtem (G1C+G1Y). Los valores de la eficiencia de FRET se calcularon sobre el área total delimitada por el contorno celular. Los datos representan la media  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.001$  en un t-test pareado con el control negativo 1,  $n=60$ .

Los valores de la eficiencia de FRET, calculados con el programa Image J, se representaron en un histograma de barras en la (Fig 20D). Estos valores se compararon con un control negativo obtenido de la co-expresión de los fluoróforos YPetm y CyPetm y un control positivo obtenido de la construcción en tándem CFP-YFP. Las células transfectadas con GLYT1-CFP y GLYT1-YFP dieron una eficiencia de FRET estadísticamente significativa ( $15.52 \% \pm 1.3\%$ ) al compararla con la obtenida para el control negativo ( $2.73 \% \pm 0.63\%$ ) y el control positivo ( $48.21\% \pm 1.85\%$   $p < 0.001$ ). La eficiencia de FRET para las células transfectadas con GLYT1-CFP y GLYT1-YFP también fue significativamente mayor que la eficiencia de FRET para células transfectadas con la pareja EAAT2-CFP y GLYT1-YFP, en la que el transportador de glutamato EAAT2-CFP actuaba como donador y GLYT1-YFP como aceptor. Este hecho indicaba que las señales positivas de FRET observadas en GLYT1 no eran producto de la sobreexpresión de dos proteínas que se localizan en la membrana plasmática.

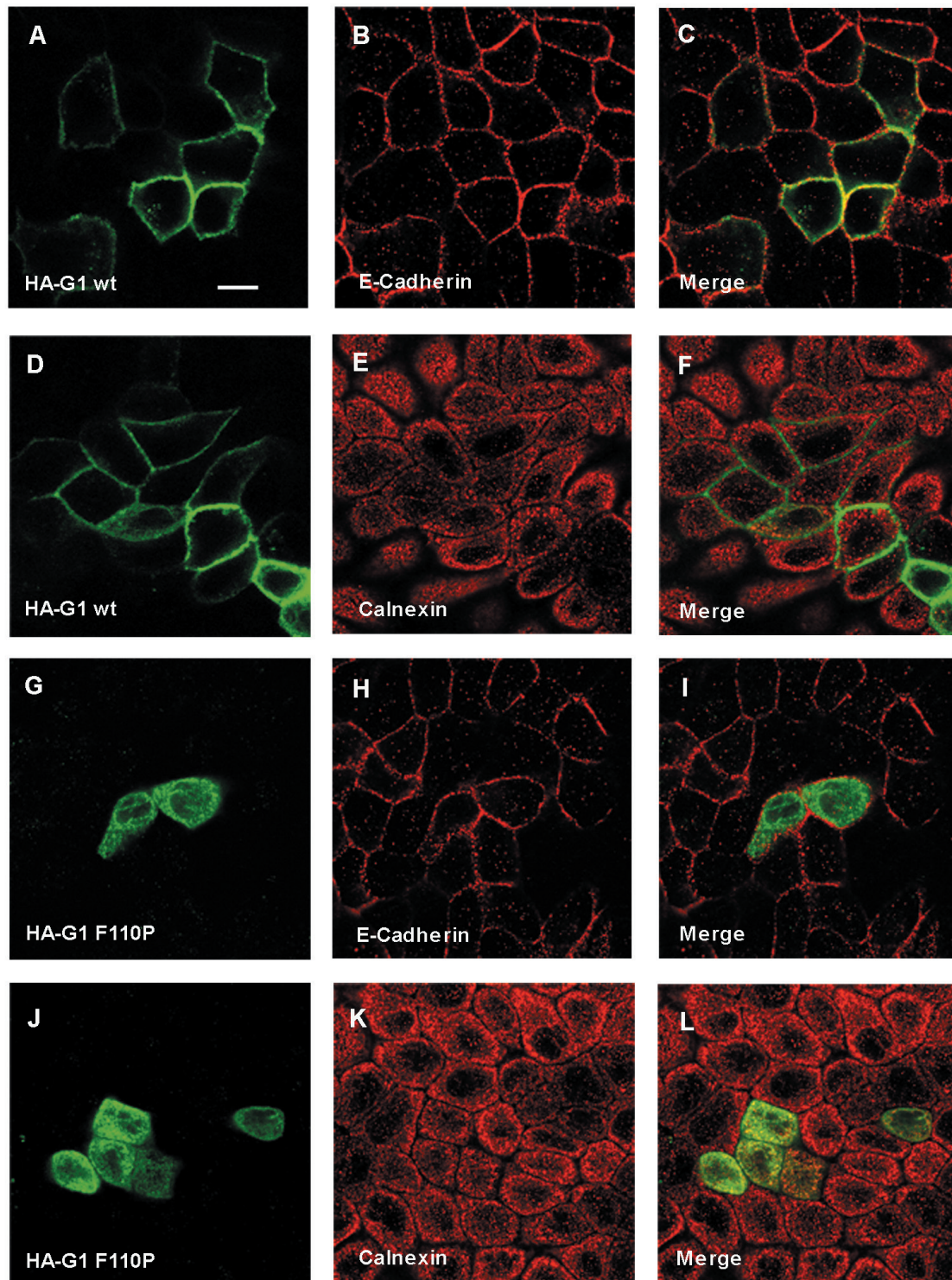
Basándonos en los resultados obtenidos en una colaboración establecida con el grupo del Dr. Harvey de la London Pharmacy School se realizó un estudio en el que se encontraron nuevos datos compatibles con la formación de oligómeros de GLYT1. En la colaboración se analizaba el fenotipo resultante de una mutación en la secuencia del gen de GLYT2 humano encontrada en pacientes de hiperplexia hereditaria, una enfermedad de origen genético en la que están implicados varios genes, todos ellos relacionados directa o indirectamente con la neurotransmisión glicinérgica.

La mutación en la secuencia de GLYT2 humano que se estudiaba era la sustitución de la Leucina<sup>269</sup> por una prolina, generando el mutante L269P. Este cambio en la proteína se encontró mediante la secuenciación de los distintos exones del transportador en muestras de sangre de pacientes humanos con la enfermedad. Posteriormente, mediante técnicas de PCR y biología molecular, se sustituyó en el cDNA de GLYT2 humano el aminoácido correspondiente a la mutación encontrada y se clonó en el vector de expresión pCDNA3 para su análisis en sistemas de expresión heterólogos.

Según los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, el mutante L269P no tenía actividad debido a que permanecía retenido en el retículo y no alcanzaba la membrana plasmática. Mediante ensayos de biotilación y transporte se observó que cuando se transfectaba este mutante junto con GLYT2 salvaje, la actividad de la proteína nativa y su concentración en la superficie celular disminuían. Estos resultados sugerían que el mutante inactivo L269P interaccionaba con el transportador nativo formando oligómeros y lo retenía de algún modo en el interior de la célula impidiendo que llegara a la membrana plasmática. El fenotipo del mutante L269P se ajustaba a la definición de dominante negativo, ya que alteraba la actividad y función de la proteína salvaje al interaccionar con ella.

La existencia de una proteína mutada de la misma familia génica que GLYT1 con un efecto dominante negativo en el tráfico intracelular reforzaba la hipótesis de que la oligomerización de los transportadores era un requisito necesario para su salida del retículo endoplasmático, y ponía de manifiesto un mecanismo de tráfico hacia la membrana plasmática de los miembros de la familia SLC6. Para comprobar si la misma sustitución en GLYT1 tenía también un efecto dominante negativo sobre el transportador nativo, se realizó la mutación homóloga a la sustitución L269P en GLYT2. Por tanto, la fenilalanina<sup>110</sup> de GLYT1 se mutó a prolina. Si el mutante generado retenía en el interior celular a la proteína original, como ocurría con GLYT2, se tendría una prueba más



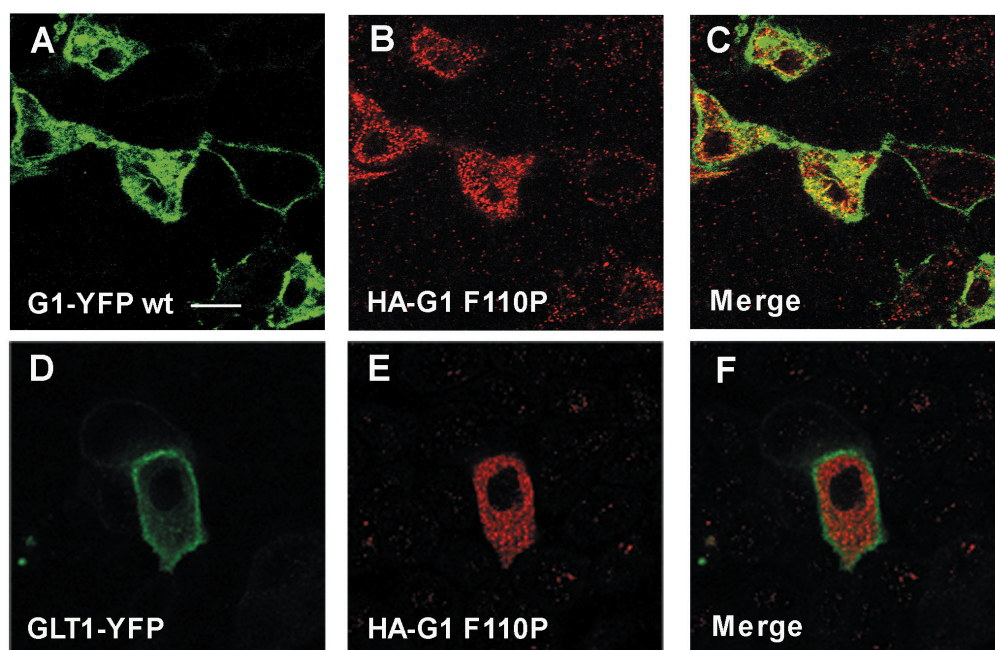


**Figura 21. Localización del mutante F110P.**

Células MDCK fueron transfectadas con HA-GLYT1b (A-F) o el mutante F110P (G-L). Dos días después, las células se marcaron en verde con el anticuerpo contra HA (A, D, G, J) y en rojo con los anticuerpos contra el marcador de membrana plasmática caderina-E (B y H) o contra el marcador de retículo endoplasmático calnexina (F y L). A continuación las células fueron fijadas y las imágenes se tomaron con un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).



de la formación de oligómeros de GLYT1. Tras realizar la sustitución por técnicas de mutagénesis dirigida, el mutante se clonó en el vector de expresión pCDNA3 con un epítipo HA en su extremo amino terminal. Una vez realizado el clonaje, la primera aproximación que se realizó con el transportador mutado F110P fue una inmunofluorescencia en células MDCK para ver su localización subcelular. En este ensayo se marcaron la membrana plasmática y el retículo endoplasmático con un anticuerpo contra caderina-E y un anticuerpo contra calnexina respectivamente. Como control positivo de la localización subcelular del transportador nativo se utilizó la construcción GLYT1-YFP. Como era de esperar, la proteína nativa se expresó en la membrana plasmática co-localizando con el marcador caderina-E (Fig. 21, A-F). Sin embargo, el mutante F110P, al igual que le ocurría a su homólogo en GLYT2, quedó retenido en el interior celular, co-localizando parcialmente con el marcador de retículo endoplasmático calnexina (Fig. 21, G-L).

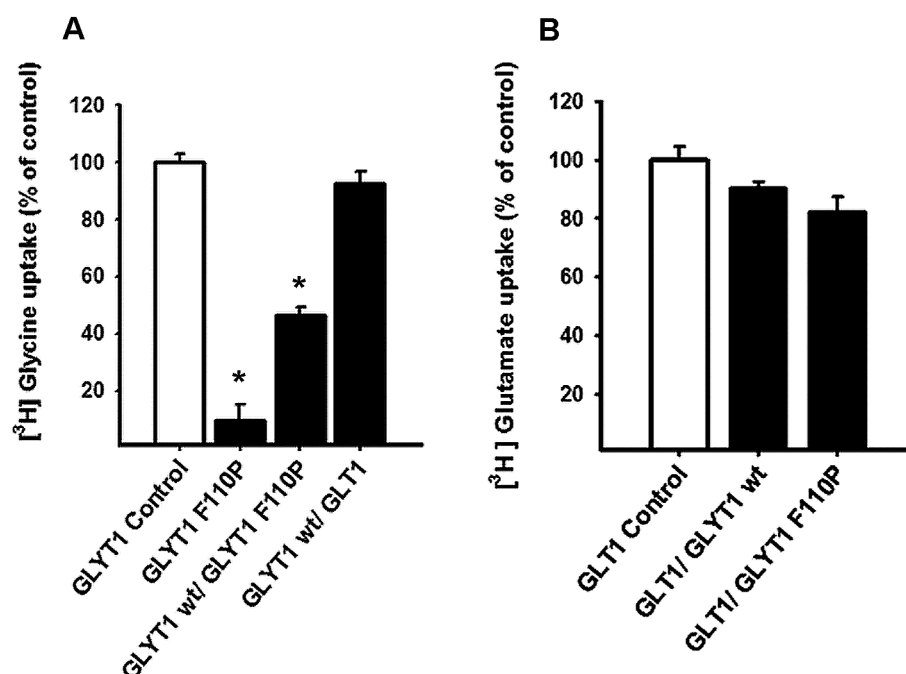


**Figura 22. Efecto dominante negativo del mutante**

Células MDCK fueron co-transfectadas con el mutante HA-F110P junto a GLYT1b-YFP (A-C), o GLT1-YFP (D-F). Dos días más tarde, las células se marcaron en rojo con el anticuerpo contra HA, se fijaron y se observaron con un microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Tras comprobar que el transportador mutado se quedaba retenido en el retículo endoplasmático, se investigó si también tenía un efecto dominante negativo sobre la proteína nativa. Para ello se realizó una inmunofluorescencia en células MDCK en la que se co-transfectaron GLYT1-YFP o GLT1-YFP junto al mutante F110P. Como ocurría con el mutante homólogo en GLYT2, la mutación F110P en GLYT1 dio como resultado un transportador que actuaba como dominante negativo sobre la proteína nativa, ya que cuando ambos transportadores se expresaron juntos, el mutante F110P retuvo a la construcción GLYT1-YFP en el interior celular (Fig. 22, A-C). Sin embargo, este efecto no se observó cuando el mutante se co-expresó con GLT1. En este caso se vio como el transportador de glutamato se expresó en la membrana plasmática mientras que la proteína mutada se expresó en el interior celular (Fig. 22, D-F).

Para verificar y cuantificar este resultado se llevó a cabo un ensayo de transporte de [ $^3\text{H}$ ] glicina en células COS-7. En esta aproximación se transfectaron solos, por un lado, el transportador nativo y el mutante para ver su actividad de transporte. Y por otro lado, se co-transfectaron GLYT1, o el mutante F110P, junto a GLYT1 nativo para ver el efecto dominante negativo en el transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina. En comparación con el 100% de [ $^3\text{H}$ ]glicina transportada por GLYT1wt, el mutante F110P sólo transportó un 10%. Cuando ambos transportadores se co-expresaron juntos, la cantidad de [ $^3\text{H}$ ]glicina transportada fue un 60% menor que la cantidad de [ $^3\text{H}$ ]glicina transportada por la proteína nativa sola ( $P < 0.001$  en test t de Student). Por el contrario, cuando GLYT1 se co-expresó con GLT1, la actividad del transportador apenas sufrió alguna variación. Este resultado confirmó de manera cuantitativa el efecto dominante negativo que tenía el mutante F110P sobre GLYT1 nativo (Fig. 23A). Mediante un ensayo de transporte de glutamato se confirmó que el efecto del mutante F110P sobre GLYT1 era exclusivo y que no afectaba a otras proteínas. En este caso, no se observó una disminución significativa de la actividad de GLT1 cuando se expresó junto al mutante F110P o junto GLYT1 nativo (Fig. 23B).



**Figura 23. Efecto dominante negativo del mutante F110P.**

A. Células COS-7 fueron transfectadas con las combinaciones que se indican en la figura. Dos días después, se analizó la cantidad de [ $^3\text{H}$ ]glicina incorporada durante 10 minutos en las células transfectadas. Los datos indican el porcentaje de [ $^3\text{H}$ ]glicina transportada por GLYT1 en presencia del mutante F110P o en presencia de GLT1 (barras negras) respecto al control (GLYT1 control) (barra blanca) y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. B. Células COS-7 fueron transfectadas con las combinaciones que se indican en la figura. Dos días después, se analizó la cantidad de [ $^3\text{H}$ ]glutamato incorporado durante 10 minutos en las células transfectadas. Los resultados indican el porcentaje de [ $^3\text{H}$ ]glutamato transportado respecto al control positivo (barra blanca) y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \* $P < 0.001$ .

## IV.2 TRÁFICO DE GLYT1 DESDE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

### IV.2.1 GLYT1 es endocitado por una vía dependiente de clatrina.

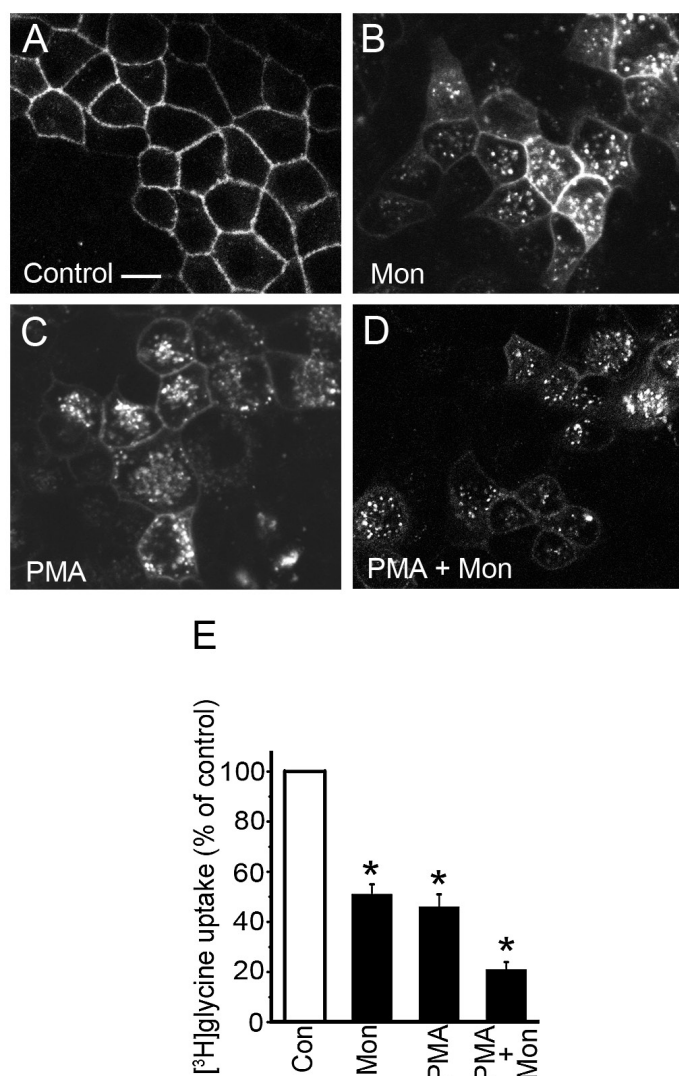
Los transportadores de la familia génica SLC6 son reguladores de la concentración de neurotransmisor en la hendidura sináptica, y su presencia es necesaria para un preciso control espacio-temporal de la neurotransmisión. Por este motivo, los mecanismos que controlan su concentración en la membrana plasmática de las células del sistema nervioso central influyen en el correcto funcionamiento de las sinapsis. Numerosos estudios han demostrado que el tráfico de membrana de estos transportadores modula dinámicamente su expresión en la superficie celular. Así, estas proteínas pueden ser endocitadas de manera constitutiva por medio de determinantes intrínsecos del transportador, o en respuesta a estímulos externos, como la exposición a psicoestimulantes o la activación de algún receptor, que activan una vía de señalización celular que controla su internalización.

Para investigar la endocitosis constitutiva de proteínas que se expresan en la membrana plasmática, una técnica muy utilizada es el uso del ionóforo carboxílico monensina (Potau et al., 1984). El tratamiento con este compuesto disipa el gradiente de protones de vesículas intracelulares e impide el transporte a través de ellas. De esta forma, se bloquea el reciclaje a la membrana plasmática y las proteínas endocitadas se acumulan en endosomas.

Investigaciones anteriores habían concluido que la activación de la proteína kinasa C (PKC) regula la internalización de GLYT1 (Gomez et al., 1995) y de varios miembros de la familia SLC6 (Miranda et al., 2005). Cuando esta proteína se activa, disminuye la expresión de los transportadores en la membrana plasmática, a la vez que aumenta su concentración intracelular. En estos ensayos se usan los ésteres de forbol como potentes activadores de la PKC, ya que los mecanismos fisiológicos que llevan a la activación de esta proteína kinasa son difíciles de simular *in vitro*. Aunque la internalización de los miembros de la familia SLC6 en respuesta a la activación de la PKC era conocida, sus mecanismos no están completamente esclarecidos, por lo que se decidió estudiar este proceso usando de nuevo como modelo la línea celular MDCK transfectadas transitoriamente con GLYT1. Estas células presentan poca concentración intracelular de intermediarios de la vía biosintética, lo que facilita el estudio de la endocitosis mediante microscopia confocal. Para localizar la proteína con mayor rapidez y facilitar los distintos tipos de ensayos que se llevaron a cabo, se utilizó la construcción de GLYT1 en la que el fluoróforo YFP está acoplado al extremo carboxilo terminal de transportador (GLYT1-YFP).

Por tanto, en primer lugar se comprobó el efecto de la monensina para visualizar la endocitosis constitutiva de GLYT1-YFP y de los ésteres de forbol para el estudio de la endocitosis regulada por PKC. En células incubadas con monensina el transportador endocitado constitutivamente quedó retenido en vesículas intracelulares (Fig. 24B), en comparación con el control negativo en el que la proteína sólo se detectó en la membrana plasmática (Fig. 24A). El tratamiento de las células con PMA provocó que la construcción se acumulara en vesículas intracelulares, indicando que este método era adecuado para estudiar la endocitosis del transportador regulada

por PKC (Fig. 24C). Cuando se combinaron los tratamientos de monensina y PMA, se vio como aumentó la cantidad de proteína endocitada (Fig 24D).



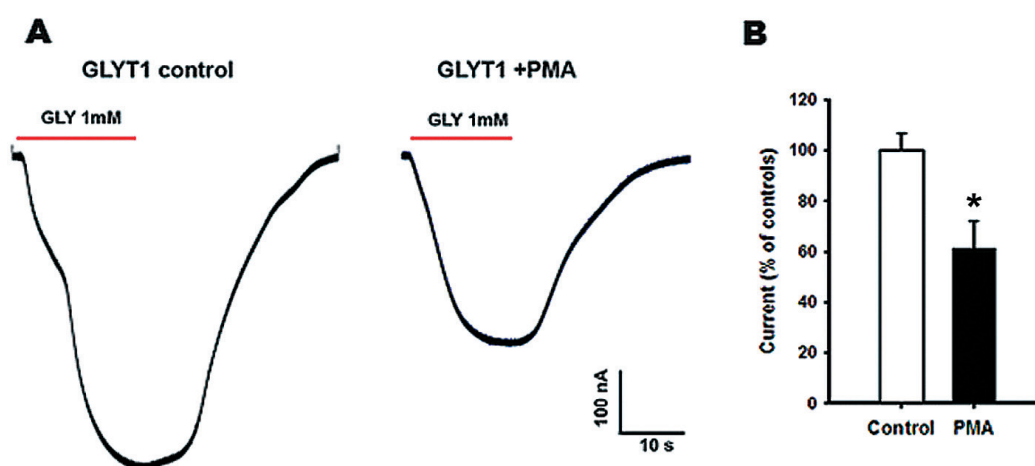
**Figura 24. El PMA y la monensina promueven la internalización de GLYT1b-YFP.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP y dos días después fueron tratadas con el vehículo (A), monensina (10  $\mu$ M, 30 min) (B), PMA (1  $\mu$ M, 30 min) (C), o ambos compuestos juntos. Las células fueron fijadas en PFA 4% y analizadas por microscopía confocal. (Barra de escala: 15  $\mu$ m). E. células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP. Dos días más tarde se analizó el transporte de [ $^3$ H]glicina durante 10 minutos de las células, pretratadas con el vehículo (con), monensina 10  $\mu$ M (mon), PMA 1  $\mu$ M (PMA), o con ambos compuestos juntos (Mon+PMA). Los resultados representan en porcentaje la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \*P<0.001.

La activación de la PKC por medio del PMA, o la retención del transportador endocitado constitutivamente en compartimentos intracelulares por medio de la monensina, daban como resultado una disminución de la cantidad de GLYT1 en la superficie celular. Para estimar cuantitativamente que porcentaje de GLYT1 se internalizaba desde la membrana plasmática cuando las células

eran tratadas con monensina, PMA o ambos compuestos juntos, se realizó un ensayo de transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina. Las células que fueron tratadas con monensina transportaron un 49% menos que las células control, mientras que en células tratadas con PMA el transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina se redujo un 54%. La combinación de ambos tratamientos llevó a una disminución del 79% en la actividad del transportador (Fig. 24E).

Otra estimación cuantitativa de la disminución del transportador de la membrana plasmática por la activación de la PKC se obtuvo a través de experimentos de electrofisiología en oocitos de *Xenopus laevis*. Mediante técnicas de TEVC se fijó el potencial de membrana a -40 mV y se midió la corriente que introducía el transportador en presencia de glicina antes y después de aplicar a la célula un tratamiento de 15 minutos con PMA. Cuando los datos de corriente de un oocito tratado con PMA se compararon con los datos de un oocito sin tratar, se vio que la corriente introducida por el transportador en presencia del éster de forbol era un 40% menor aproximadamente (Fig. 25). A pesar de que la disminución de la actividad de GLYT1 por efecto del PMA fue ligeramente menor en estos experimentos que la disminución observada en el transporte de [ $^3\text{H}$ ]glicina, el hecho de que en dos sistemas heterólogos tan distintos se tuvieran estimaciones cuantitativas similares, confirmaba que la activación de la PKC disminuía en torno a un 55% la actividad de GLYT1.



**Figura 25. El tratamiento con PMA reduce la corriente asociada al transporte de glicina de GLYT1b.**

A. Experimento representativo. Oocitos de *Xenopus* fueron inyectados con el ARN mensajero de GLYT1b. Cinco días más tarde, se fijó el potencial de membrana de los oocitos inyectados a -40 mV y se analizaron las corrientes asociadas al transporte de glicina antes y después de perfundir durante 15 minutos medio Na<sup>+</sup> con PMA 1  $\mu\text{M}$ . B. Histograma de los valores de corriente. Los datos representan el porcentaje de corriente introducida por un oocito en presencia de PMA (PMA) (barra negra) respecto a la corriente introducida por ese mismo oocito sin PMA (Control) (barra blanca). Los resultados muestran la media de cuatro oocitos diferentes  $\pm$  S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \* $P < 0.001$ .

También por técnicas de electrofisiología se investigó como afectaban los cambios del potencial de membrana a la disminución de la actividad de GLYT1 por la activación de la PKC. Este experimento se realizó para comprobar que dicha disminución en la actividad del transportador era



debida a una menor cantidad de proteína en la membrana y no a que el PMA hubiera generado una alteración en la estructura de GLYT1 que afectara al transporte de glicina. En este ensayo se medía la corriente de transporte introducida por GLYT1 a distintos potenciales, antes y después de un tratamiento de 15 minutos con PMA. Comparando las corrientes que introdujo el transportador en presencia de PMA, con las corrientes que introdujo antes del tratamiento, se observó que la curva I-V en presencia del activador de la PKC era de menor amplitud pero de igual forma que la curva I-V control (Fig. 26). Esto indicaba que los residuos implicados en el transporte de glicina e iones sodio no habían sido afectados por el PMA y que la disminución en la amplitud de la curva se debía a una menor concentración de transportador en la membrana plasmática.

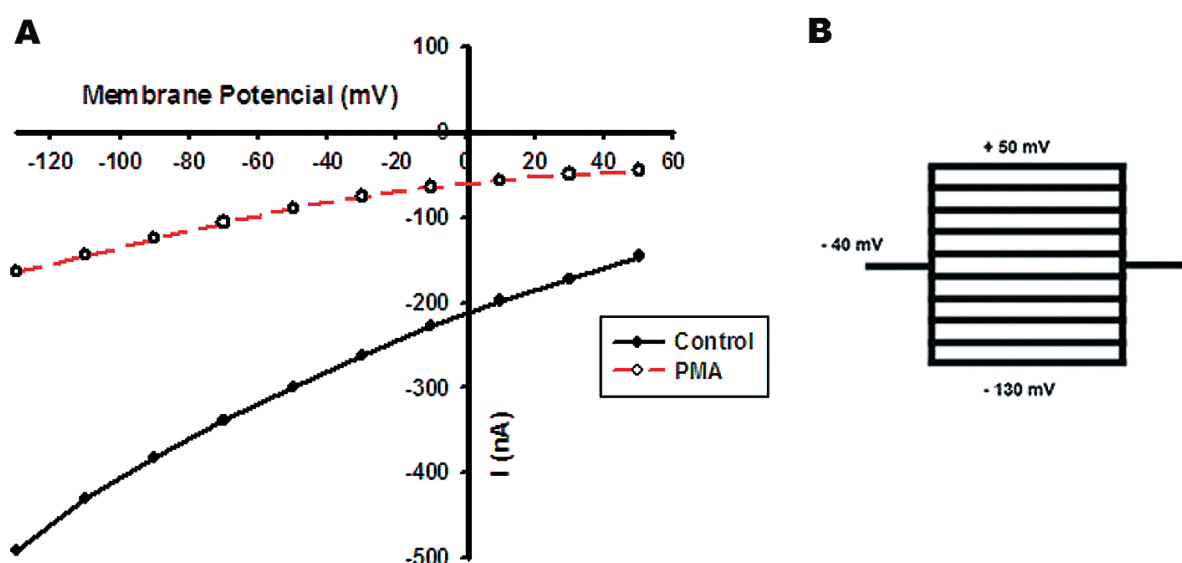
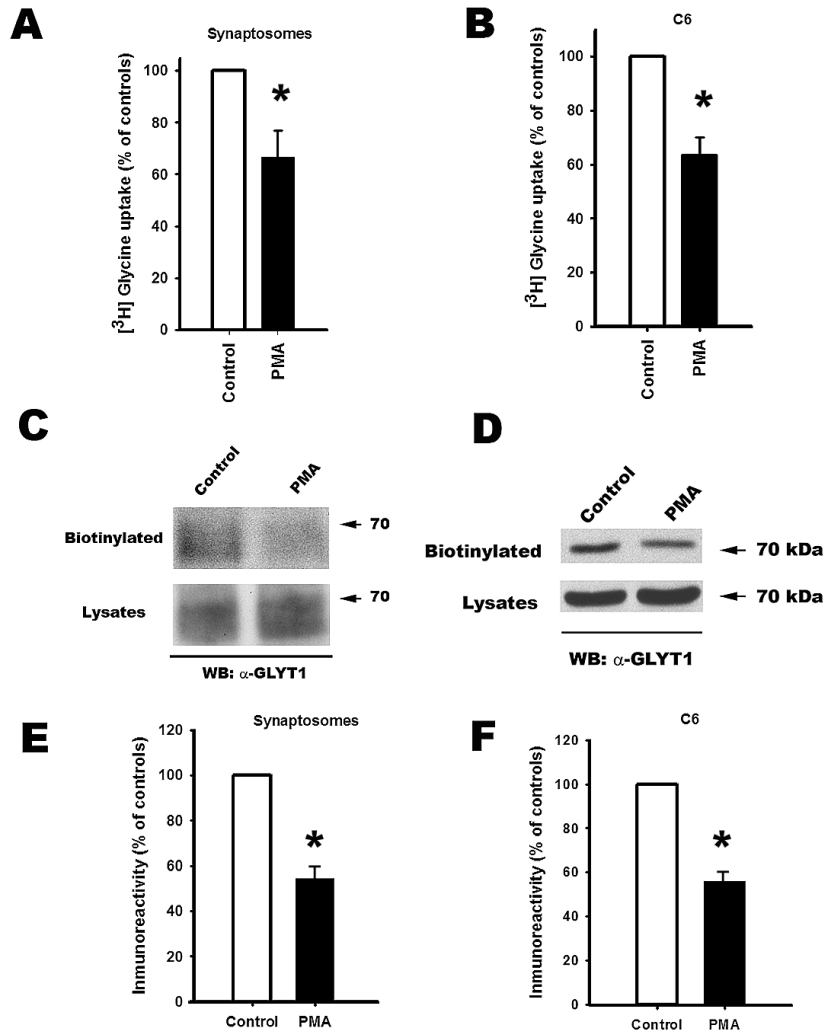


Figura 26. El tratamiento con PMA no afecta al mecanismo de transporte de glicina de GLYT1b.

A. Oocitos de *Xenopus* fueron inyectados con el ARN mensajero de GLYT1b. Cinco días más tarde, se fijó el potencial de membrana de los oocitos inyectados a  $-40$  mV y se analizó la corriente introducida a distintos potenciales de membrana, antes y después de perfundir durante 15 minutos medio  $\text{Na}^+$  con PMA  $1 \mu\text{M}$ . La curva I-V representada se obtiene de restar la corriente introducida por un oocito en ausencia de glicina a la corriente introducida por ese mismo oocito en presencia de glicina. B. Esquema representativo del protocolo de saltos de potencial utilizado. El potencial de membrana parte de  $-40$  mV y va variando en saltos de  $-20$  mV desde  $+50$  mV a  $-130$  mV (10 saltos).

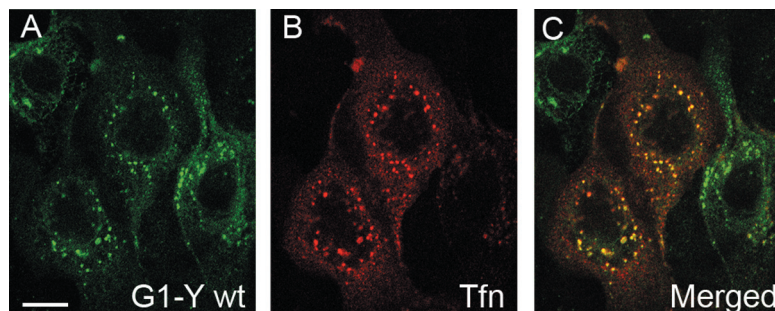
El efecto del PMA en la endocitosis de GLYT1 también se observó en sinaptosomas de médula espinal de rata y en la línea celular C6 derivada de un glioblastoma. En ensayos de transporte de  $[^3\text{H}]$ glicina, la actividad del transportador disminuyó alrededor de un 35% cuando ambos tipos de muestras se incubaron con PMA (Fig. 27, A-B). Acorde con este resultado, se comprobó mediante experimentos de biotilación de proteínas de membrana que el tratamiento con este compuesto redujo un 54% la concentración de GLYT1 en la superficie de los sinaptosomas, y un 56% en la superficie de las células C6 (Fig. 27, C-F). Todos estos datos indicaban que, tanto en un sistema heterólogo de expresión de proteínas, como en muestras que expresaban el transportador de manera endógena, la activación de la PKC promovía la internalización de GLYT1.



**Figura 27. El PMA promueve la internalización de GLYT1 en sistemas que expresan el transportador de manera endógena.**

A. Los sinaptosomas obtenidos como se indica en materiales y métodos fueron incubados con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos (PMA). Posteriormente se analizó la [<sup>3</sup>H]glicina incorporada durante 10 minutos en un ensayo de transporte. B. Células C6 fueron sometidas a un tratamiento con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos (PMA). Posteriormente se analizó la cantidad de [<sup>3</sup>H]glicina incorporada por las células durante 10 minutos. Los resultados representan en porcentaje la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \*P<0.001. C. Los sinaptosomas fueron incubados con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos (PMA). Posteriormente se sometieron a un tratamiento con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml en PBSc durante 20 minutos a 4°C. La reacción se neutralizó mediante la incubación de las muestras con lisina 100mM durante 1 hora a 4°C. A continuación los sinaptosomas se lisaron con RIPA y las proteínas biotiniladas se recuperaron con una matriz de estreptavidina agarosa para ser analizadas por SDS-PAGE y se analizaron por inmunodetección usando un anticuerpo contra GLYT1. D. Células C6 fueron incubados con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos (PMA). Posteriormente se sometieron a un tratamiento con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml en PBSc durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas biotiniladas se recuperaron con una matriz de estreptavidina agarosa para ser analizadas por SDS-PAGE y se analizaron por inmunodetección usando un anticuerpo contra GLYT1. E-F. Análisis densitométrico de la biotinilación de sinaptosomas y células C6 respectivamente. Los resultados representan en porcentaje la media de tres experimentos  $\pm$  S.E.M. Los datos fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \*P<0.001.

Una vez cuantificada la actividad de la proteína que permanecía en la membrana plasmática cuando las células se incubaban con PMA y monensina, se intentó determinar a qué tipo de vesículas intracelulares se endocitaba GLYT1 con estos tratamientos. En células MDCK transfectadas con GLYT1-YFP y tratadas con PMA y monensina, se vio que gran parte de la proteína endocitada co-localizaba con el marcador de endosomas tempranos y de reciclaje transferrina Texas-red (Fig. 28). Este hecho sugería que el transportador internalizado se acumulaba en estos compartimentos intracelulares al tratar las células con estos compuestos.



**Figura 28. PMA y monensina promueven la internalización de GLYT1b a endosomas tempranos y de reciclaje.**

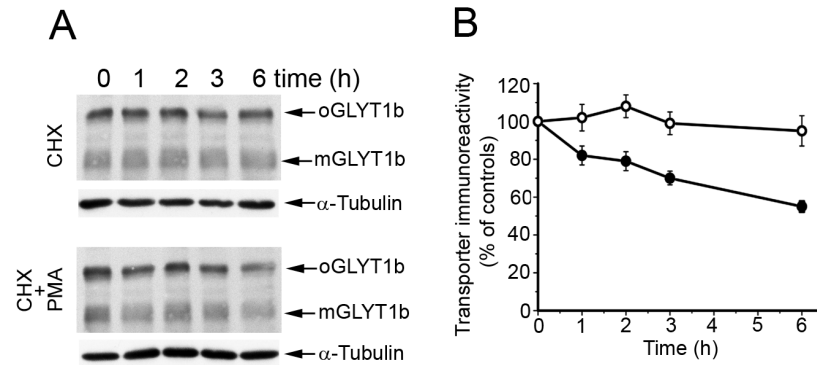
Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP (G1-Y) y un vector de expresión para el receptor de transferrina humano (Tfn). Dos días más tarde las células se incubaron con transferrina Texas red durante 30 min y fueron expuestas a un tratamiento de PMA y monensina como se indica en materiales y métodos. Después de los tratamientos, las células fueron fijadas con PFA al 4% y analizadas por microscopia confocal.

Para analizar si el transportador endocitado en endosomas tempranos tras el tratamiento con PMA era enviado a degradación o se acumulaba en estos compartimentos intracelulares para su posterior reciclaje a la membrana plasmática, se bloqueó la síntesis de nuevas proteínas mediante un pre-tratamiento con cicloheximida y se analizó la estabilidad del transportador en presencia o ausencia del activador de la PKC. De este modo, en extractos de células MDCK transfectadas con GLYT1-YFP, se observó que la cantidad de transportador se redujo un 42% después de 6 horas de tratamiento con PMA.

Sin embargo, en células control, tratadas sólo con cicloheximida, GLYT1-YFP permaneció estable ya que sus niveles sólo disminuyeron en un 5% (Fig. 29). Este hecho indicaba que la proteína endocitada en respuesta a la activación de la PKC era destinada a degradación en comparación con la proteína de las células control, donde el transportador permanecía estable para el reciclaje a la membrana plasmática.

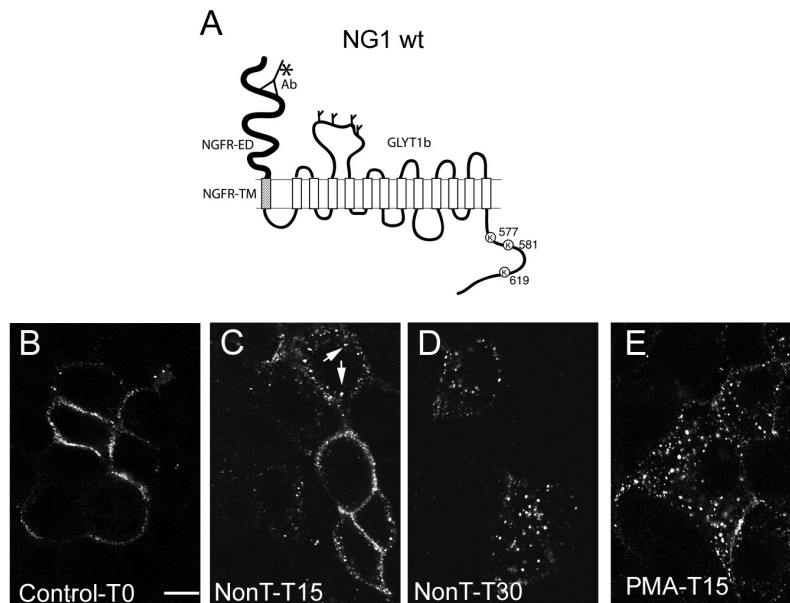
Debido a que la disminución de GLYT1 en la superficie celular observada en los experimentos anteriores podía ser debida a una ralentización de la inserción del transportador en la membrana plasmática, se llevó a cabo un ensayo para poder ver directamente la proteína que se endocitaba. Para ello se construyó una quimera compuesta por el dominio extracelular y transmembrana de la proteína p75 NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) unida a GLYT1 por su extremo amino terminal (NG1wt) (Fig. 30A). En este experimento se bloqueó el tráfico intracelular mediante la incubación de las células a 4°C y se marcó esta construcción con un anticuerpo contra el dominio extracelular del NGFR (Fig 30B). Una vez marcada la proteína, se reinstauró el tráfico incubando las células a 37°C para permitir que la quimera marcada se endocitara de manera constitutiva.





**Figura 29. Efecto del PMA en la estabilidad de GLYT1b.**

A. Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP y dos días después fueron preincubadas durante 2 horas con cicloheximida (CHX) 50  $\mu$ M. A continuación el tratamiento continuó, durante los tiempos indicados, con CHX (50  $\mu$ M) o con CHX+PMA (50  $\mu$ M+1  $\mu$ M). Posteriormente los lisados celulares se resolvieron por SDS-PAGE y se analizaron por inmunodetección usando un anticuerpo contra GFP. Como control de carga se analizó la cantidad de tubulina en los lisados celulares. Las flechas indican los monómeros (mGLYT1b) o los oligómeros (oGLYT1b) del transportador. B. Las bandas correspondientes a los monómeros y a los oligómeros de GLYT1 se cuantificaron por densitometría, se sumaron y se representaron como porcentajes respecto al valor densitométrico del tiempo 0. Los valores representan la media de tres experimentos  $\pm$  S.E.M. (○) CHX, (●) CHX+PMA.

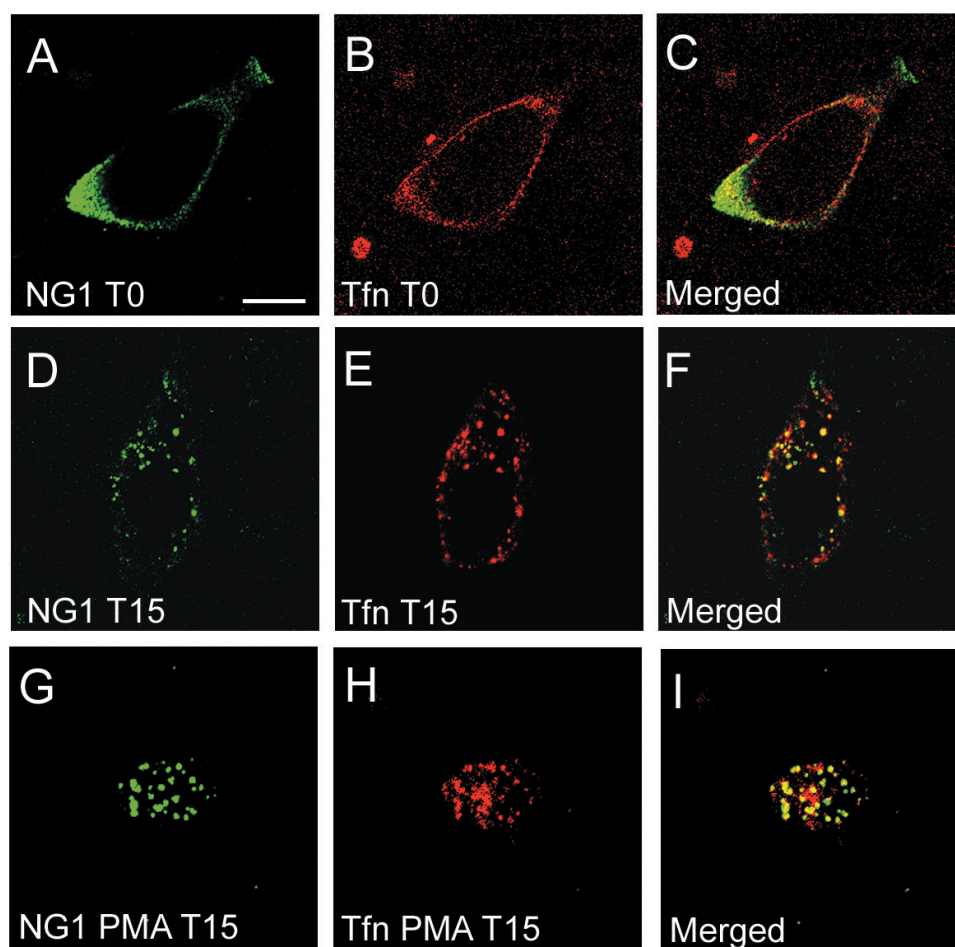


**Figura 30. Endocitosis de la quimera NGFR-GLYT1b.**

A. Esquema de la quimera NG1 compuesta por los dominios extracelular (NGFR-ED) y transmembrana (NGFR-TM) del receptor de NGF acoplado al extremo amino de GLYT1b. Las lisinas del extremo carboxilo terminal del transportador mutadas en este estudio están representadas y numeradas. La unión del anticuerpo anti-NGFR (ab) al dominio extracelular de NGFR y la unión del anticuerpo secundario están representadas con los símbolos Y y \*. B-E. Células MDCK fueron transfectadas con la construcción NG1-wt y dos días después fueron marcadas a 4°C con el anticuerpo anti-NGFR y el anticuerpo secundario. A continuación, las células se fijaron (B) o se incubaron a 37°C con el vehículo 15 minutos (C) o 30 minutos (D), o con PMA 1  $\mu$ M 15 minutos (E). Después de los tratamientos las células fueron fijadas con PFA al 4% y analizadas por microscopía confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

De esta forma se vio que tras 15 minutos de incubación a 37°C la proteína se empezaba a acumular en vesículas intracelulares y que, tras 30 minutos de incubación, la quimera se había endocitado constitutivamente por completo (Fig 30, C-D). Esta técnica también fue utilizada para investigar directamente el efecto que tenía el PMA sobre la endocitosis constitutiva de GLYT1. Así, se comprobó que la incubación de las células con PMA a 37°C aceleró la endocitosis del transportador, ya que tras 15 minutos de incubación, la proteína estaba completamente acumulada en compartimentos intracelulares (Fig. 30E).

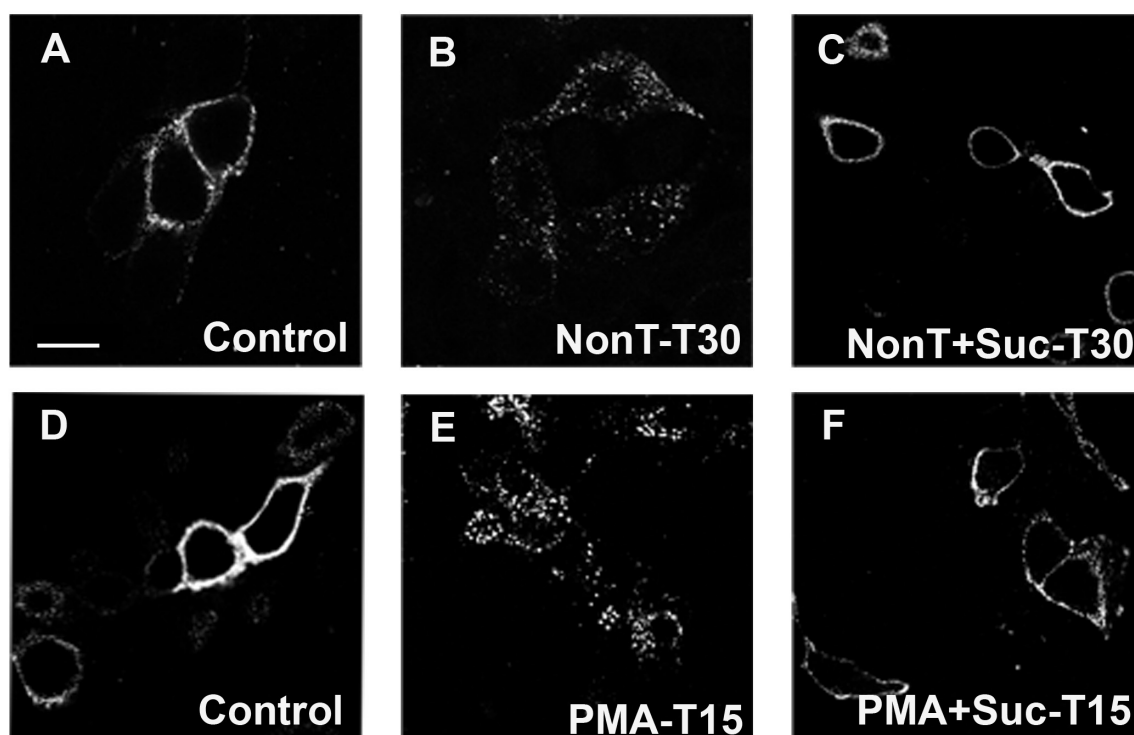
En experimentos de inmunofluorescencia doble llevados a cabo en células MDCK, la quimera NG1wt endocitada tanto de manera constitutiva, como en respuesta al tratamiento con PMA, co-localizaron con transferrina, un marcador de endosomas tempranos y de reciclaje (Fig. 31). Este hecho coincidía con el resultado observado para GLYT1-YFP y sugería que ambos tipos de internalización compartían la misma vía de endocitosis a través de endosomas.



**Figura 31. Endocitosis de la quimera NGFR-GLYT1b a endosomas tempranos y de reciclaje.**

Células MDCK fueron co-transfectadas con la construcción NG1-wt y el receptor de transferrina (TFn). Dos días después fueron marcadas a 4°C con el anticuerpo anti-NGFR, el anticuerpo secundario y transferrina Texas red. A continuación, las células se fijaron (A-C) o se incubaron 15 minutos a 37°C con el vehículo (D-F) o PMA 1  $\mu$ M (G-I). Las células fueron fijadas con PFA al 4% y analizadas por microscopía confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Una vez determinado el compartimento intracelular donde GLYT1 era endocitado, se realizaron varios experimentos para identificar la vía por la que el transportador se internalizaba de manera constitutiva y en respuesta al tratamiento con PMA. En una primera aproximación para comprobar si la endocitosis del transportador ocurría por una vía dependiente de clatrina, se incubaron células MDCK transfectadas con la quimera NG1wt en un medio con una concentración elevada de sacarosa. El tratamiento con sacarosa hipertónica es un método clásico de desorganización de la red de clatrina y, por consiguiente, de bloqueo de la endocitosis dependiente de dicha proteína (Daukas et al., 1985). A través de este ensayo se observó que, en presencia sacarosa 0.4M, tanto la internalización constitutiva de la construcción NG1wt (30 minutos a 37°C) como la regulada (15 minutos a 37°C con PMA) quedaron totalmente bloqueadas (Fig. 32).



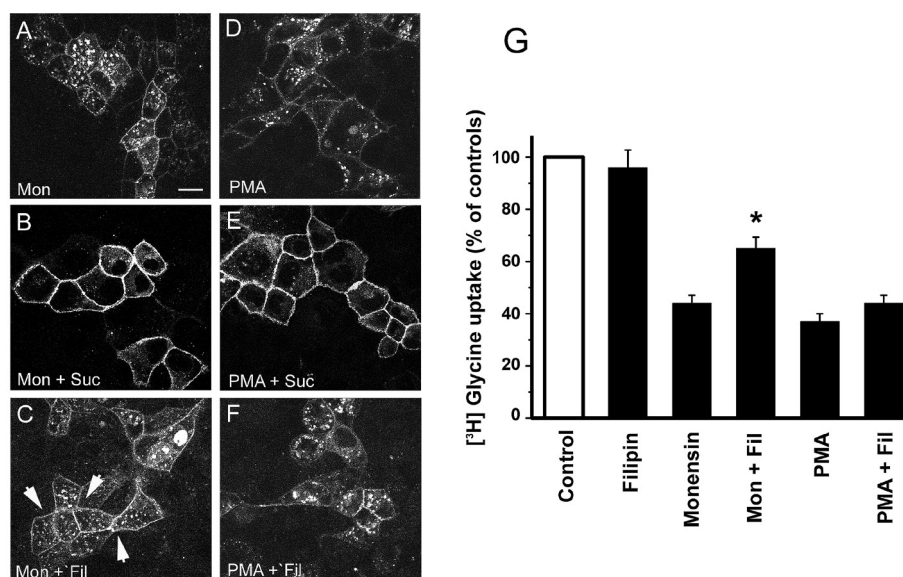
**Figura 32. La endocitosis constitutiva y regulada por PMA de NGFR-GLYT1b se bloquea por sacarosa hipertónica.**

Células MDCK fueron transfectadas con la construcción NG1-wt y dos días después fueron marcadas a 4°C con el anticuerpo anti-NGFR y el anticuerpo secundario. A continuación, las células se fijaron (control) (A y D) o se incubaron 30 minutos a 37°C con el vehículo (NonT-T30)(B), con el vehículo mas sacarosa 0.4M (NonT+Suc-T30) (C), 15 minutos con PMA (PMA-T15) (E) o 15 minutos con PMA mas sacarosa 0.4M (PMA+Suc-T15)(F). Posteriormente a los tratamientos, las células fueron fijadas con PFA al 4% y analizadas por microscopia confocal. (Barra de escala 15 µm).

Un resultado similar se obtuvo en un ensayo de inmunofluorescencia en el que se sometieron a concentraciones hipertónicas de sacarosa células MDCK transfectadas con GLYT1-YFP e incubadas con monensina o PMA. En este caso la internalización de la proteína se bloqueó mayoritariamente, aunque no por completo, en presencia de sacarosa tanto en las células tratadas con PMA como con monensina (Fig. 33, B y E). Este hecho sugería que, además de la vía dependiente de clatrina, podía existir una vía de endocitosis constitutiva de GLYT1 alternativa y minoritaria. Para investigar si esa vía

de internalización dependía de dominios ricos en colesterol, se sometió a las células transfectadas con GLYT1b-YFP y tratadas con PMA o monensina a un tratamiento de filipina. Este compuesto disgrega los dominios de membrana ricos en colesterol y por lo tanto inhibe la endocitosis asociada a ellos. Así, en este experimento se vio que en presencia de filipina había una mayor cantidad de GLYT1 en la membrana de las células tratadas con monensina (Fig. 33C). Mientras que en las células incubadas con PMA, no se observó ninguna variación con el tratamiento con este compuesto (Fig. 33F).

Para cuantificar que porcentaje de transportador estaba implicado en la vía de endocitosis dependiente de dominios de membrana ricos en colesterol se realizó un ensayo de transporte de [ $^3$ H]glicina. En él se vio que la actividad de GLYT1 en células incubadas con monensina y filipina aumentaba significativamente un 22% en comparación con células incubadas sólo con monensina ( $P < 0.001$  en test t de Student). En células tratadas con PMA, la presencia de filipina no produjo un aumento significativo de la actividad del transportador. Este resultado confirmaba los datos vistos en el experimento de inmunofluorescencia anterior y ponía de manifiesto que un porcentaje de la proteína endocitada constitutivamente lo hacía por una vía dependiente de dominios de membrana plasmática ricos en colesterol (Fig. 33G).



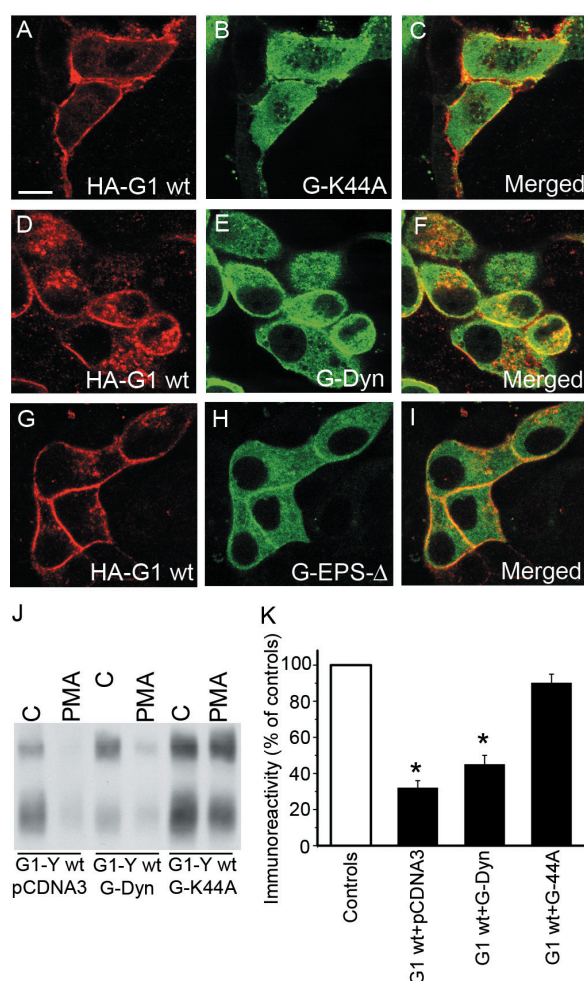
**Figura 33. La endocitosis constitutiva y regulada por PMA de GLYT1b-YFP se bloquea por sacarosa hipertónica.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP. Dos días después se sometieron a tratamientos con monensina 10  $\mu$ M (A-C) o PMA 1  $\mu$ M (D-F), y cuando se indica, se trataron con sacarosa 0.4M (B y E) o filipina 10  $\mu$ M 1 hora (C y F). A continuación, las células fueron fijadas con PFA al 4% y analizadas por microscopia confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m). Las flechas señalan la membrana plasmática de las células tratadas con monensina + filipina. G. Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP. 48 horas más tarde las células se sometieron a los tratamientos que se indican. Posteriormente se analizó la cantidad de [ $^3$ H]glicina incorporada por las células durante 10 minutos en un ensayo de transporte. Los resultados representan en porcentaje la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los datos de las células tratadas con Mon+Fil o PMA+Fil se compararon con los datos de las células tratadas con Mon o PMA usando el test t de Student.\*  $P < 0.001$ .

Mediante ensayos de inmunofluorescencia se observó que la internalización de GLYT1 también dependía de las proteínas dinamina 2 y EPS15. Estas proteínas intervienen en la vía de endocitosis dependiente de clatrina. La dinamina 2 es una GTPasa de 100Kda encargada de la



formación de vesículas en la membrana plasmática y EPS15 es un adaptador de la cubierta proteica encargado de reconocer las proteínas que se van a endocitar. En presencia de los dominantes negativos de estas proteínas (Dyn-K44A y EPS15 $\Delta$ ) se bloqueó la endocitosis del transportador en células MDCK tratadas con monensina y PMA (Fig 34, A-C; G-I). Sin embargo, en presencia de dinamina 2 nativa, GLYT1 se endocitó normalmente en respuesta a estos tratamientos (Fig. 34, D-F). Una cuantificación del efecto de la dinamina 2 en la endocitosis del transportador regulada por PMA se obtuvo mediante un ensayo de biotilación en células MDCK. En este experimento se observó que en presencia de dinamina 2 nativa, o en el control positivo, la cantidad de GLYT1 presente en la membrana se reducía entre un 60-70% en respuesta al tratamiento con PMA. Sin embargo, la co-expresión de GLYT1 con el dominante negativo de dinamina 2 sólo redujo un 10% la cantidad de transportador en la membrana plasmática (Fig. 34, J-K).

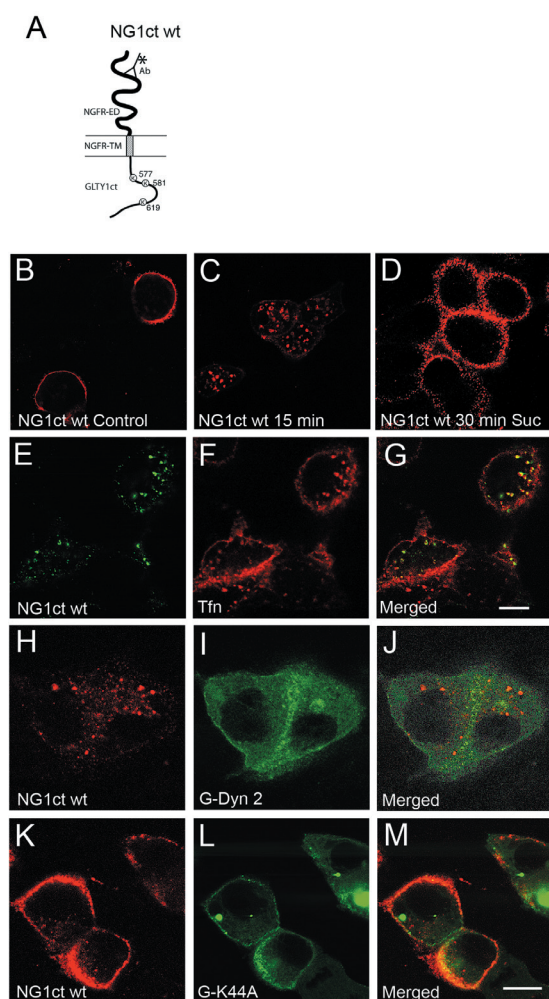


Por tanto, todos estos experimentos demostraban que GLYT1 se endocita de manera constitutiva a endosomas tempranos y que la activación de la PKC acelera este proceso. La vía de internalización del transportador es mayoritariamente dependiente de clatrina y dinamina 2, aunque una proporción menor de la proteína se endocita por una vía dependiente de dominios de membrana ricos en colesterol (lipid rafts) en células MDCK.

### IV.2.2 La endocitosis de GLYT1 depende de lisinas de su extremo carboxilo terminal.

Una vez determinada la principal vía de endocitosis, se quiso investigar el mecanismo por el que el transportador GLYT1 era reclutado a las vesículas de clatrina. El análisis bioinformático de la secuencia de GLYT1 reveló la existencia de posibles motivos de endocitosis en el extremo carboxilo terminal del transportador en forma de dos motivos di-leucina. Este tipo de motivo proteico es responsable de la endocitosis dependiente de clatrina de un buen número de proteínas de membrana. Además, estudios previos de nuestro laboratorio (Poyatos et al., 2000) habían determinado que los motivos di-leucina L<sup>572</sup>L<sup>573</sup> y L<sup>590</sup>L<sup>591</sup> eran importantes en el tráfico basolateral de GLYT1.

Para investigar de forma más rápida y sencilla las posibles señales de internalización del extremo carboxilo terminal de GLYT1 se realizó una quimera compuesta por este dominio del transportador fusionado al dominio extracelular y transmembrana de la proteína p75 NGFR (NG1ct-wt) (Fig. 35A). Antes de trabajar con esta quimera y mutar en ella las posibles señales de endocitosis de GLYT1, se comprobó si esta construcción era endocitada mediante los mismos mecanismos que el transportador nativo para poder extrapolar las conclusiones de estos experimentos a la proteína original. Así, en ensayos de endocitosis se observó que la quimera NG1ct-wt era endocitada junto al receptor de transferrina a endosomas tempranos (Fig. 35, E-G). También en estos experimentos

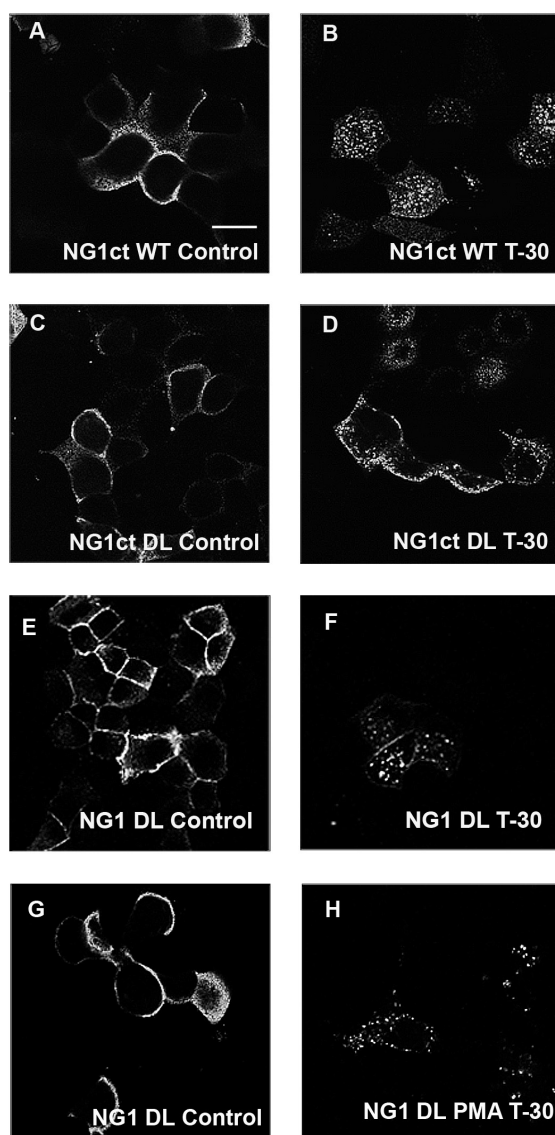


**Figura 35. La quimera NG1ct-wt se endocita a endosomas de reciclaje por una vía dependiente de clatrina.**

A. Esquema de la quimera NG1ct-wt compuesta por los dominios extracelular (NGFR-ED) y transmembrana (NGFR-TM) del receptor de NGF acoplado al extremo carboxilo terminal de GLYT1b (GLYT1ct). B-D. Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NG1ct-wt. Dos días después las células se marcaron con los anticuerpos contra el dominio extracelular de NGFR y se fijaron (B) o se incubaron 15 minutos a 37°C (C) o 30 minutos con sacarosa 0.4M antes de la incubación de 15 minutos a 37°C (D). E-G. Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NG1ct-wt y el receptor de transferrina. Dos días después las células se marcaron con los anticuerpos contra el dominio extracelular de NGFR y con transferrina Texas red, incubadas 15 minutos a 37°C y fijadas. H-J. Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NG1ct-wt y GFP-dinamina 2. Dos días más tarde las células fueron marcadas como en B, incubadas 15 minutos a 37°C y fijadas. K-M. Células MDCK fueron co-transfectadas con la quimera NG1ct-wt y la construcción GFP-dinamina 2 K44A. Dos días después las células fueron marcadas como en B, incubadas 15 minutos a 37°C y fijadas con PFA 4%.

se vio que la endocitosis de esta construcción se bloqueaba en presencia del dominante negativo de dinamina2 (Dyn K44A) (Fig. 35, H-M) o mediante la incubación de las células con sacarosa hipertónica (Fig. 35 B-D), lo cual indicaba que NG1ct-wt, al igual que GLYT1, se internalizaba por una vía dependiente de clatrina.

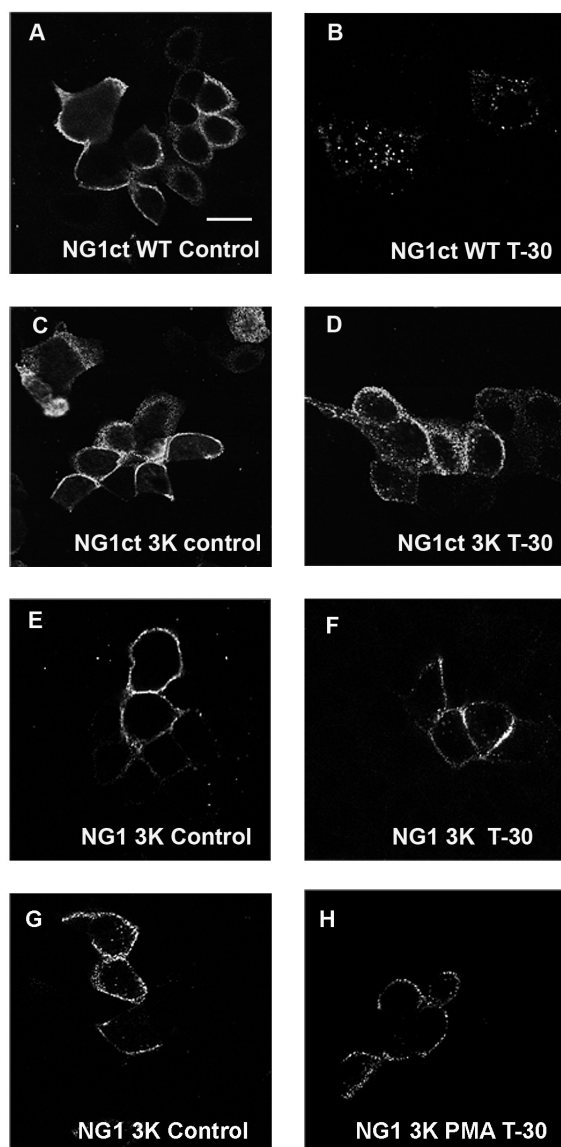
Una vez comprobada la funcionalidad de la construcción NG1ct-wt en los ensayos de endocitosis, se mutaron mediante técnicas de mutagénesis dirigida los residuos de los motivos dileucina (NG1ct-DL). En un ensayo de endocitosis en células MDCK se vio que la mutación de dicho motivo bloqueó parcialmente la endocitosis de la construcción (Fig. 36, A-D). Sin embargo, el cambio de estas leucinas en el contexto del transportador entero en la construcción de GLYT1 con el dominio extracelular y transmembrana de NGFR (NG1 DL), dio como resultado un mutante que se internalizaba constitutivamente y en respuesta al tratamiento con PMA de manera similar a la construcción del transportador nativo (ver figura 30), descartando que este motivo interviniese en la endocitosis de GLYT1 (Fig. 36, E-H).



**Figura 36. El motivo dileucinas del extremo carboxilo terminal de GLYT1b no interviene en la endocitosis constitutiva y regulada por PMA del transportador.**

Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NG1ct WT (A-B), NG1ct DL (C-D), NG1 DL (E-H). Dos días después de la transfección, se marcaron a 4°C con el anticuerpo contra el dominio extracelular de NGFR. A continuación, parte de las células se fijaron (A, C, E, G), mientras que otras se incubaron 30 minutos a 37°C (B, D, F) o 30 minutos a 37°C con PMA 1 μM (H). Posteriormente, las células incubadas a 37°C se fijaron y todas las preparaciones se analizaron en el microscopio confocal. (Barra de escala 15 μm). Comparar la endocitosis constitutiva y regulada por PMA de la quimera NG1 DL con la quimera con GLYT1 nativo (figura 30 D-E).

En los últimos años se ha identificado un nuevo motivo de internalización de numerosas proteínas de membrana consistente en la ubiquitinación de las mismas seguida del reclutamiento de los adaptadores de clatrina. Debido a que las moléculas de ubiquitina se unen a lisinas por medio de ubiquitin-ligasas, se decidió mutar en la quimera NG1ct las tres lisinas presentes en el extremo carboxilo terminal de GLYT1 ( $K^{577}$ ,  $K^{581}$  y  $K^{619}$ ) a argininas para comprobar si podían actuar como una señal de internalización del transportador. En ensayos de endocitosis en células MDCK se vio que la quimera con las tres lisinas mutadas (NG1ct-3K) no pudo ser internalizada (Fig. 37, A-D). Para confirmar este resultado, las mismas sustituciones fueron llevadas a cabo en la construcción de NGFR con la secuencia del transportador entero NG1 (NG1-3K). En este caso, las mutaciones provocaron que la proteína quimérica no se endocitara ni de manera constitutiva, ni con el tratamiento de las células con PMA (Fig. 37, E-H). De esta forma, se confirmó que la sustitución de las lisinas del extremo carboxilo terminal de GLYT1 impedía que el transportador se endocitara, sugiriendo que estos aminoácidos podrían actuar como señal de internalización de la proteína.



**Figura 37. Las lisinas del extremo carboxilo terminal de GLYT1b intervienen en la endocitosis constitutiva y regulada por PMA del transportador.**

Células MDCK fueron transfectadas con la quimera NG1ct WT (A-B), NG1ct 3K (C-D), NG1 3K (E-H). Dos días después de la transfección, se marcaron a 4°C con el anticuerpo contra el dominio extracelular de NGFR. A continuación, parte de las células se fijaron (A, C, E, G), mientras que otras se incubaron 30 minutos a 37°C (B, D, F) o 30 minutos a 37°C con PMA 1 μM (H). Posteriormente las células incubadas a 37°C se fijaron y todas las preparaciones se analizaron en el microscopio confocal. (Barra de escala 15 μm). Comparar la endocitosis constitutiva y regulada por PMA de la quimera NG1 3K con la quimera con GLYT1 nativo (figura 30 D-E).



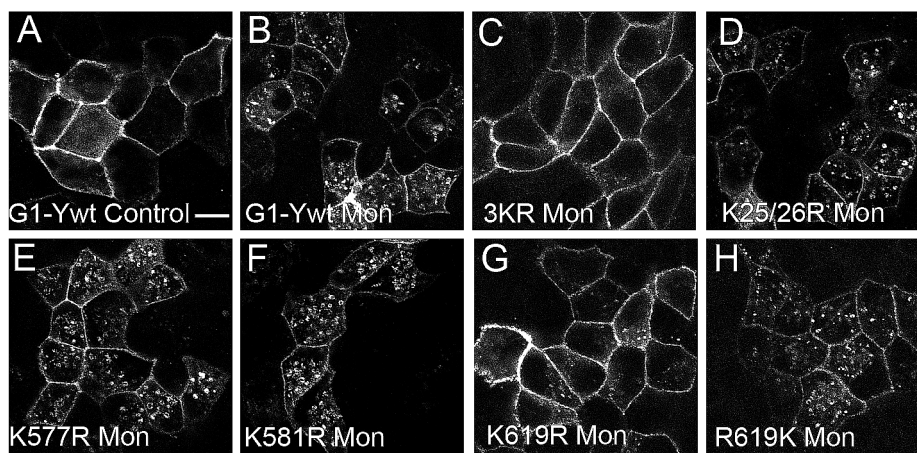
En el contexto del transportador completo unido a al fluoróforo YFP se llevó a cabo un estudio preciso de las lisinas de los extremos amino y carboxilo de GLYT1 para determinar cuál de ellas desempeñaba un papel más importante en el proceso de la internalización constitutiva del transportador. Para poder hacer esta investigación se realizaron una serie de mutaciones en las que se sustituyeron por argininas las distintas lisinas de los extremos citoplasmáticos del transportador. De esta forma se generaron los mutantes que aparecen en la tabla 1.

Nombre del Mutante	Lisinas mutadas
<b>K25/26R</b>	Las dos lisinas del extremo amino
<b>K577R</b>	La lisina 577 del extremo carboxilo
<b>K581R</b>	La lisina 581 del extremo carboxilo
<b>K619R</b>	La lisina 619 del extremo carboxilo
<b>5KR</b>	Las dos lisinas del extremo amino y las tres lisinas del extremo carboxilo
<b>3KR</b>	Las tres lisinas del extremo carboxilo
<b>R619K</b>	Reintroducción de la lisina 619 en el mutante 3K

**Tabla 1. Mutantes generados mediante la sustitución de las distintas lisinas citoplasmáticas de GLYT1b.**

En experimentos de inmunofluorescencia en células MDCK se investigó como afectaban las mutaciones de las distintas lisinas a la endocitosis constitutiva de GLYT1 (Fig. 38). De esta forma, en presencia de monensina, se vio que la sustitución de las tres lisinas del extremo carboxilo terminal (3KR) bloqueó la endocitosis (Fig. 38C). Sin embargo, el cambio de estos aminoácidos en el extremo amino (K25/26R) no produjo ningún efecto y la proteína se internalizó de manera similar a GLYT1 nativo (Fig. 38D). En el análisis para determinar si alguno de los tres residuos sus-

tituidos en el extremo carboxilo era más importante en la internalización constitutiva de GLYT1, se vio que el mutante K619R no había sido endocitado en comparación con los mutantes K577R y K581R que sí que lo fueron (Fig. 38 E-G). Para confirmar que este aminoácido era importante en este proceso, se reintrodujo la lisina 619 en el mutante 3KR (R619K). Al hacerlo, el transportador volvió a recuperar la capacidad de ser endocitado (Fig. 38H).



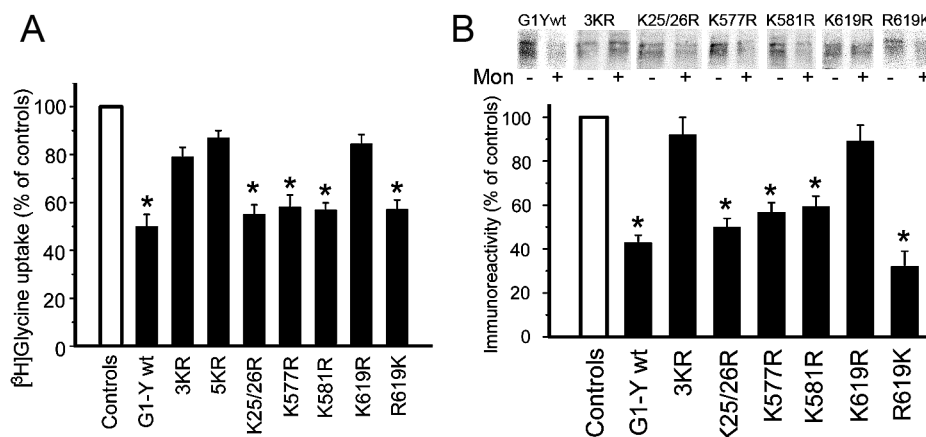
**Figura 38. Las lisinas citoplasmáticas de GLYT1b son importantes para la endocitosis constitutiva del transportador**

Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones de los mutantes de lisina que se indican en la figura. 48 horas más tarde se expusieron a un tratamiento con el vehículo (control, A) o con monensina 10  $\mu$ M durante 30 minutos. (Mon, B, C, D, E, F, G, H). A continuación las células fueron fijadas y se analizaron por el microscopio confocal. Para simplificar la figura sólo se muestra las células control transfectadas con GLYT1b-YFP. El resto de controles de las otras construcciones son similares a él. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Para obtener una estimación cuantitativa del efecto de las mutaciones de las distintas lisinas se realizaron experimentos de transporte de [ $^3$ H]glicina posterior a la incubación de las células con monensina. Considerando como 100% el valor de [ $^3$ H]glicina transportada por los controles transfectados con GLYT1 nativo y no tratados con monensina, la actividad del transportador se redujo un 50% tras el tratamiento con el ionóforo. Los mutantes K25/26R, K577R y K581R mostraron una actividad y sensibilidad a monensina similares al transportador nativo. Sin embargo, el mutante 5KR y el mutante 3KR transportaron alrededor del 80% de [ $^3$ H]glicina de sus respectivos controles tras la adición de monensina, lo que es consistente con la escasa endocitosis constitutiva observada en estos mutantes en los experimentos de inmunofluorescencia. La sustitución individual de la lisina 619 tuvo un efecto parecido al de los mutantes 3KR y 5KR en la actividad del transportador. Este hecho destacaba la importancia de este residuo, ya que al eliminarlo GLYT1 perdía la capacidad de ser internalizado constitutivamente. Es más, la reintroducción de la lisina 619 sobre el mutante 3KR (R619K) restituyó la sensibilidad a monensina del transporte de [ $^3$ H]glicina a niveles similares a los del transportador nativo (Fig. 39A).

Estos resultados fueron confirmados por la cuantificación densitométrica de un ensayo de biotilación de proteínas de membrana. En este experimento, los transportadores presentes en la membrana plasmática de células MDCK fueron marcados con biotina tras la incubación del cultivo con monensina. Después de la recuperación de las proteínas marcadas, se analizaron por densito-

metría las bandas obtenidas en la inmunodetección. Respecto a los controles de células sin tratar, el porcentaje de los distintos transportadores presentes en la membrana plasmática fue similar a los datos obtenidos en los ensayos de transporte de [ $^3$ H]glicina. Así, el porcentaje de los mutantes 3K y K619R presentes en la membrana plasmática fue superior al 80%, mientras que el porcentaje de los transportadores mutados que eran internalizados (K25/26R, K577R y K581R) fue entorno al 60%. Este ensayo volvió a confirmar que la lisina 619 era importante en la endocitosis constitutiva de GLYT1, ya que en presencia de monensina, el porcentaje del mutante R619K en la superficie celular fue similar al de GLYT1 nativo (Fig. 39B).

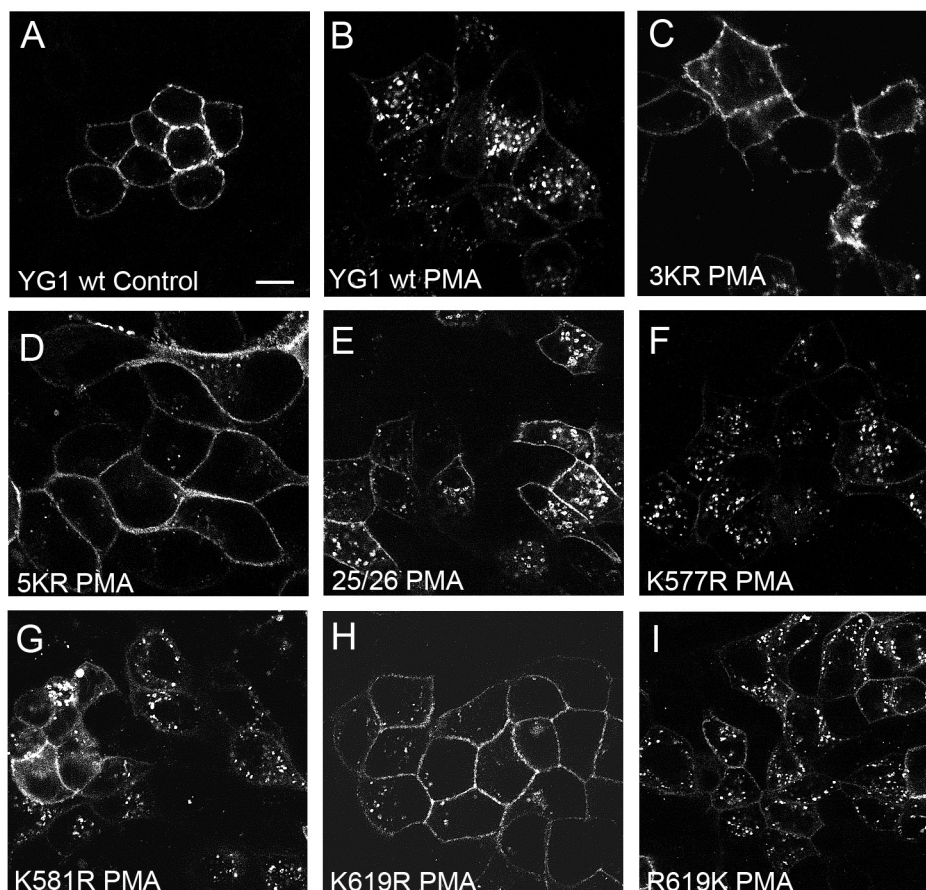


**Figura 39. Las lisinas citoplasmáticas de GLYT1b son importantes para la endocitosis constitutiva del transportador.**

A. El transporte de [ $^3$ H]glicina se midió durante 10 minutos en células transfectadas con las construcciones de GLYT1b-YFP o los distintos mutantes de lisinas que se indican en la figura. Antes del ensayo de transporte las células se incubaron con el vehículo (control, barra blanca) o con monensina 10  $\mu$ M durante 30 minutos (barras negras). Los resultados se expresan como el porcentaje de [ $^3$ H]glicina incorporada por las células en comparación con sus respectivos controles sin tratar y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. B. Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones indicadas. Dos días después se trataron con el vehículo o con monensina 10  $\mu$ M 30 minutos. A continuación las células fueron biotiniladas con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml en PBSc durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas marcadas se recuperaron con una matriz de estreptavidina agarosa para ser analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección usando un anticuerpo contra GFP. Por simplicidad sólo se muestra el monómero los monómeros del transportador. Las bandas inmunoreactivas se sometieron a un análisis densitométrico y los valores obtenidos fueron representados como el porcentaje de proteína en membrana en comparación a los respectivos controles sin tratar. Los datos indican la media de tres experimentos  $\pm$  S.E.M y fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \*P<0.001.

Los resultados obtenidos hasta ahora indicaban que la lisina 619 era importante para la endocitosis constitutiva de GLYT1, ya que al eliminarla el transportador no podía ser internalizado. Por otra parte, puesto que la quimera NG1-3K descrita más arriba no se endocitaba en respuesta al tratamiento con PMA y que la internalización constitutiva y regulada por PKC de GLYT1 comparten la misma vía de endocitosis, se quiso investigar si las lisinas de los extremos amino y carboxilo del transportador también eran importantes en la endocitosis de GLYT1 regulada por PKC (Fig. 40). De este modo, en experimentos de inmunofluorescencia de células MDCK transfectadas con los distintos mutantes de las lisinas, se observó que el mutante 3KR no se endocitaba en presencia de PMA (Fig. 40C). En este experimento tampoco se internalizaba el mutante 5KR (Fig. 40D). Sin

embargo, las sustituciones individuales hechas en los transportadores K577R, K581R y K25/26R no provocaron ningún efecto y los mutantes se internalizaron de manera similar a GLYT1b nativo (Fig. 40, E-G). Sólo el cambio en la lisina 619 provocó que la proteína no se internalizara, indicando que este residuo es crucial tanto para la endocitosis constitutiva, como para la regulada por PKC (Fig. 40H). De hecho, la reintroducción de este aminoácido en el mutante 3KR volvió a reinstaurar la capacidad de GLYT1b de ser endocitado en respuesta a PMA (Fig. 40I).



**Figura 40. Las lisinas citoplasmáticas de GLYT1b son importantes para la endocitosis regulada por PMA del transportador.**

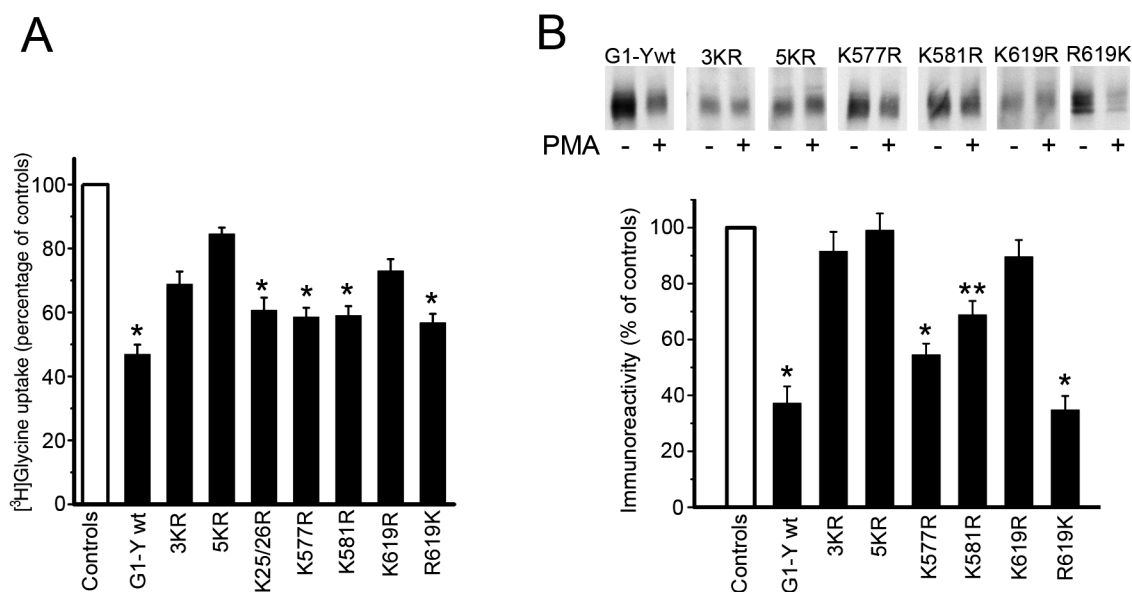
Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones de los mutantes de lisina que se indican en la figura. 48 horas más tarde se expusieron a un tratamiento con el vehículo (control, A) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos. (PMA, B, C, D, E, F, G, H, I). A continuación las células fueron fijadas y se analizaron por el microscopio confocal. Para simplificar la figura sólo se muestra las células control transfectadas con GLYT1b-YFP. El resto de controles de las otras construcciones son similares a él. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Debido a la dificultad de cuantificar los efectos vistos en los ensayos de microscopia, se realizó un experimento de transporte de [ $^3$ H]glicina en células MDCK transfectadas con los mutantes y tratadas previamente con PMA. Respecto al porcentaje de [ $^3$ H]glicina transportada por los controles sin tratar, la actividad de GLYT1b nativo se redujo más de un 56%, mientras que en los mutantes 3KR y 5KR la actividad se redujo menos de un 31% y 16% respectivamente. La funcionalidad de los mutantes K577R, K581R y K25/26R fue de un 60% aproximadamente. Sin embargo, la sustitución individual de la lisina 619 tuvo el mismo efecto visto en el mutante 3KR. De nuevo,



en el mutante de reintroducción R619K se reinstauró la capacidad de endocitosis mediada por PKC del transportador y su actividad fue cercana al 60% (Fig. 41A).

La disminución de la actividad vista en los ensayos de transporte se reflejó en una disminución de la concentración de transportador presente en la membrana plasmática. En un experimento de biotinilación se comprobó que el tratamiento con PMA redujo un 60% la cantidad de GLYT1 nativo en la membrana plasmática. Sin embargo, esta reducción fue menos de un 12% en los mutantes 3KR, 5KR y K619R. En consonancia con los ensayos de microscopia y los de transporte de [ $^3$ H]glicina, la reintroducción de la lisina 619 reinstauró completamente la endocitosis en respuesta al tratamiento con PMA del transportador (Fig. 41B).



**Figura 41. Las lisinas citoplasmáticas de GLYT1b son importantes para la endocitosis regulada por PMA del transportador.**

A. El transporte de [ $^3$ H]glicina se midió durante 10 minutos en células transfectadas con las construcciones de GLYT1b-YFP o los distintos mutantes de lisinas que se indican en la figura. Antes del ensayo de transporte las células se incubaron con el vehículo (control, barra blanca) o con PMA 1  $\mu$ M durante 30 minutos (barras negras). Los resultados se expresan como el porcentaje de [ $^3$ H]glicina incorporada por las células en comparación con sus respectivos controles sin tratar y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. B. Células MDCK fueron transfectadas con las construcciones indicadas. Dos días después se trataron con el vehículo o con PMA 1  $\mu$ M 30 minutos. A continuación las células fueron biotiniladas con Sulfo-NHS-Biotina 1 mg/ml en PBSc durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas marcadas se recuperaron con una matriz de estreptavidina agarosa para ser analizadas por SDS-PAGE e inmunodetección usando un anticuerpo contra GFP. Por simplicidad sólo se muestra el monómero los monómeros del transportador. Las bandas inmunoreactivas se sometieron a un análisis densitométrico y los valores obtenidos fueron representados como el porcentaje de proteína en membrana en comparación a los respectivos controles sin tratar. Los datos indican la media de tres experimentos  $\pm$  S.E.M y fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \* $P < 0.001$ .

Los experimentos realizados sugerían que la lisina 619 tenía un papel importante en la endocitosis de GLYT1, ya que al mutarla el transportador no podía ser endocitado ni de manera constitutiva, ni regulada por PKC. En un análisis de los parámetros cinéticos de GLYT1 se vio que la  $V_{max}$  del mutante K619R se alteraba cuando las células eran tratadas con PMA o monensina.

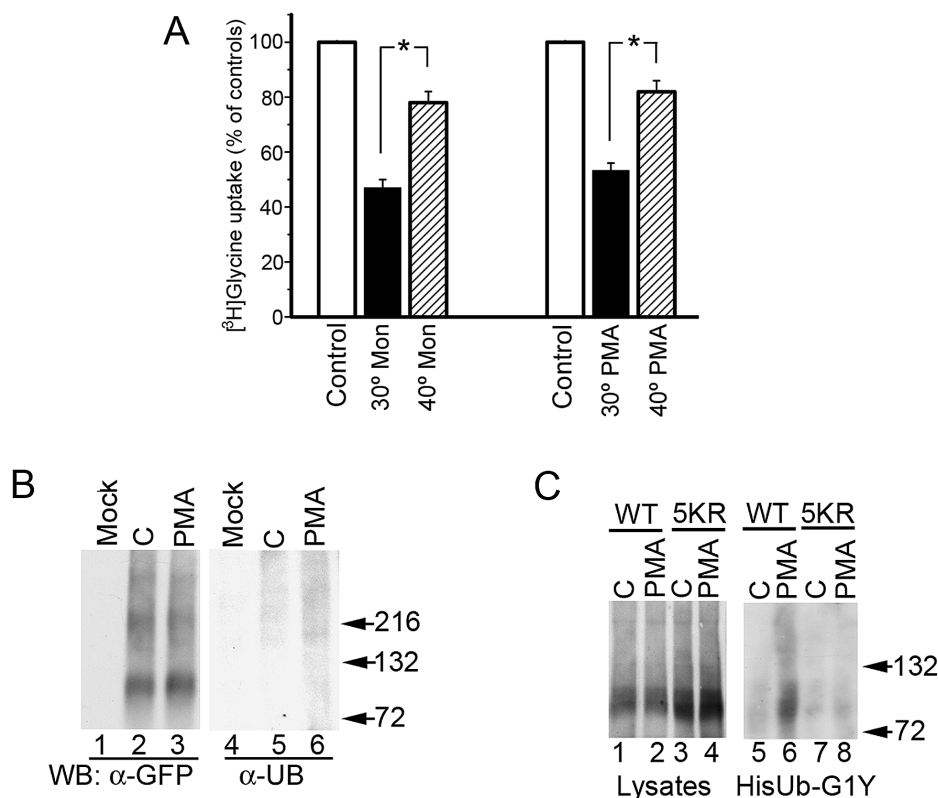
Sin embargo, la reintroducción de este residuo en el mutante 3KR reinstauraba los valores de este parámetro (Tabla 2). Mediante este ensayo, también se comprobó que en ninguno de los dos transportadores estaba afectada la  $K_m$ , lo que indicaba que estas mutaciones no alteraban la afinidad por glicina sino la cantidad de sustrato transportado.

Construct	$K_m$	$V_{max}$
Treatment		
	$\mu M$	nmol/ 6 min/ mg protein (% of controls)
GLYT1b wt		
Control	278±20	5.53±0.24 (100)
Monensin	285±48	3.15±0.40 (57)*
PMA	249±41	3.03±0.28 (54)*
K619R		
Control	229±25	4.64±0.17 (100)
Monensin	293±69	3.89±0.24 (85)
PMA	197±44	4.13±0.26 (89)
R619K		
Control	238±47	4.87±0.19 (100)
Monensin	244±38	2.53±0.26 (52)*
PMA	185±35	2.39±0.22 (49)*

**Tabla 2. Valores de la  $K_m$  y  $V_{max}$  de distintas construcciones de GLYT1b.**

El transporte de [ $^3H$ ]glicina se analizó durante 6 minutos en células MDCK transfectadas con GLYT1b-YFP o con los distintos mutantes que se indican en la tabla. Las células se trataron con el vehículo (control), con monensina 10  $\mu M$  (Mon) o con PMA 1  $\mu M$  (PMA) 30 minutos antes de realizar el ensayo de transporte. Los datos indicados representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M y fueron comparados con los controles usando el test  $t$  de Student. \* $P < 0.001$ .

Según los resultados obtenidos, la importancia de la lisina 619 en la endocitosis de GLYT1 sugería que la ubiquitinación del transportador podría ser la señal necesaria para su internalización, ya que las lisinas son los aminoácidos donde se unen las moléculas de ubiquitina por medio de ubiquitin-ligasas. En una primera aproximación para comprobar si la ubiquitinación del transportador estaba relacionada con su endocitosis se realizó un ensayo de transporte de [ $^3H$ ]glicina en la línea celular ts20 (Fig. 42A). En estas células existe una mutación dependiente de la temperatura en la enzima de activación de la ubiquitinación E1 (Kulka et al., 1988). De esta forma, si las células se incuban a 40°C, se bloquea esta proteína y se inhibe el proceso de unión de moléculas de ubiquitina. Mediante este experimento, se vio que en células crecidas a 30°C (temperatura permisiva) el tratamiento con monensina redujo la actividad de GLYT1 un 53%, mientras que el tratamiento con PMA la redujo un 47%. Sin embargo, cuando las células se incubaron durante 6 horas a 40°C antes de realizar el ensayo de transporte, la actividad de GLYT1 se redujo menos de un 30% con ambos tratamientos. Este hecho sugería que la inhibición en el proceso de ubiquitinación afectaba a la endocitosis del transportador.



**Figura 42. Ubiquitinación de GLYT1b.**

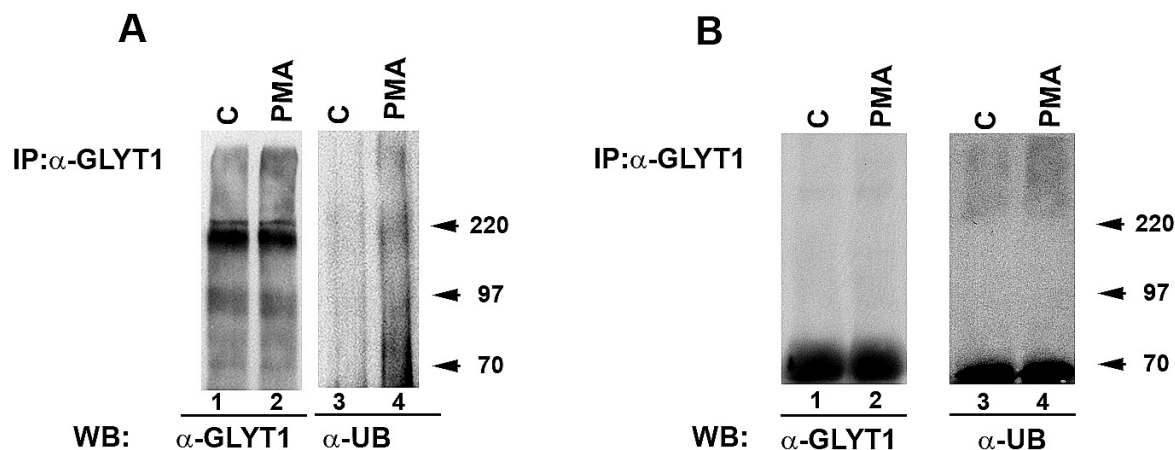
A. Células Ts20 fueron transfectadas con GLYT1b-YFP y mantenidas a 30°C durante dos días. Posteriormente, la mitad de las células se incubaron 6 horas a 40°C, mientras la otra mitad se mantuvieron a 30°C. A continuación las células se incubaron 30 minutos a 37°C con el vehículo (control), monensina 10  $\mu$ M (Mon) o PMA 1  $\mu$ M (PMA). El transporte de [<sup>3</sup>H]glicina en las células control y en las células incubadas a 40°C se analizó como se indica en materiales y métodos. Los datos indican el porcentaje de [<sup>3</sup>H]glicina transportada respecto a los controles y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M. Los resultados fueron comparados con los controles usando el test t de Student. \*P<0.001. B. células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP o pCDNA3 (Mock) y dos días más tarde se incubaron con el vehículo (control) o PMA 1  $\mu$ M (PMA). GLYT1b-YFP fue inmunoprecipitado de los lisados celulares con un anticuerpo contra GFP y analizado por SDS-PAGE e inmunodetección. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo contra ubiquitina (líneas 4-6) o contra GFP (1-3). C. Células MDCK fueron co-transfectadas con GLYT1b-YFP, o el mutante 5KR, junto a la construcción His-ubiquitina. Dos días después fueron tratadas con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M (PMA) durante 30 minutos. Después de lisar las células, los transportadores se aislaron con una columna de níquel-agarosa, se lavaron y se eluyeron para ser analizados por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra GFP (5-8). La presencia de GLYT1b-YFP en los lisados fue analizada mediante inmunodetección con el anticuerpo contra GFP.

Mediante técnicas de inmunodetección se encontraron más evidencias de la relación existente entre la ubiquitinación de GLYT1 y su internalización. Usando el anticuerpo  $\alpha$ -GFP en ensayos de inmunoprecipitación en células MDCK transfectadas con GLYT1-YFP, se vio que al revelar la membrana con un anticuerpo contra ubiquitina el transportador presentaba un patrón característico de ubiquitinación en comparación con células transfectadas con el vector vacío. Ese mismo patrón se hizo más intenso cuando las células se incubaron previamente con PMA, indicando que la activación de la PKC aumentaba el proceso de ubiquitinación de GLYT1 (Fig. 42B).



Debido a que no se podía descartar que el patrón de ubiquitinación observado en los ensayos de inmunoprecipitación fuera causado por la presencia de otras proteínas biotiniladas que co-inmunoprecipitaran con GLYT1, se llevó a cabo un experimento con unas condiciones desnaturalizantes fuertes para aumentar la especificidad del ensayo y evitar la presencia de proteínas asociadas. En esta aproximación, se co-transfectaron células MDCK con GLYT1-YFP, o el mutante 5KR, junto a una construcción en la que la molécula de ubiquitina estaba unida a una cola de histidinas (His-Ub). Los lisados de estas células se incubaron con una columna de afinidad de níquel y se lavaron sucesivamente en condiciones desnaturalizantes fuertes (6M Guanidinio-HCl). Posteriormente, se comprobó mediante inmunodetección la presencia de GLYT1 en el eluido de una columna de afinidad de níquel. Esta aproximación confirmó que el tratamiento con PMA aumentaba la ubiquitinación del transportador. Sin embargo, este aumento no se observó en las células transfectadas con el mutante 5KR, indicando que el proceso es dependiente de la presencia de las lisinas del transportador (Fig. 42C).

Una vez confirmado que la activación de la PKC por medio del PMA aumentaba la ubiquitinación de GLYT1 en un sistema heterólogo, se quiso comprobar mediante experimentos de inmunoprecipitación si ese aumento también ocurría en sistemas que expresaban GLYT1 de manera endógena. En estos ensayos se precipitó el transportador procedente de lisados de sinaptosomas de médula espinal de rata o de la línea celular C6, para, posteriormente, comprobar mediante inmunodetección la presencia de moléculas de ubiquitina en el inmunoprecipitado. Gracias a esta técnica se vio que el tratamiento con PMA aumentaba en ambos tipos de muestra la ubiquitinación del transportador (Fig. 43). Este resultado sugería que el efecto del PMA en la endocitosis de GLYT1 no era sólo producto de la expresión del transportador en un sistema heterólogo, sino que la activación de la PKC podría ser un mecanismo fisiológico de regulación de la endocitosis de la proteína.

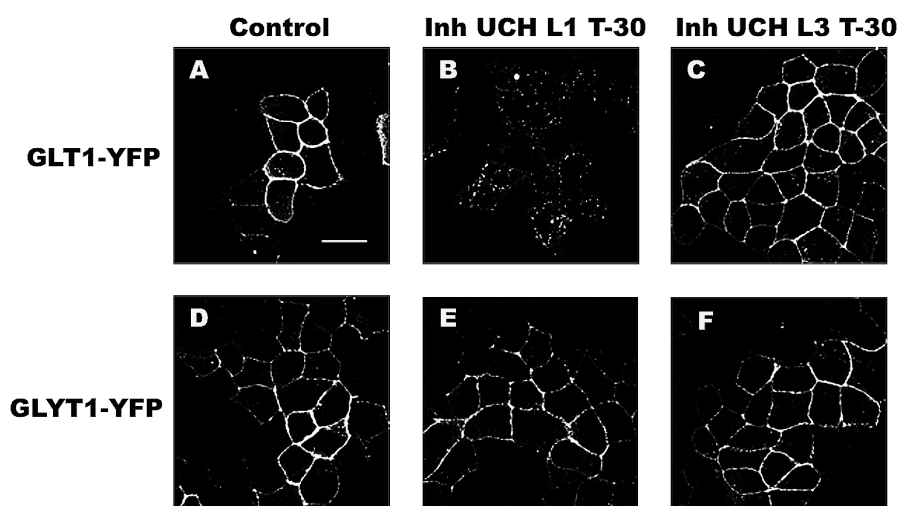


**Figura 43. Ubiquitinación de GLYT1b en sistemas que expresan el transportador de manera endógena.**

A. Células C6 se incubaron con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M (PMA) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente el transportador se inmunoprecipitó usando un anticuerpo contra GLYT1 y se analizó por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra ubiquitina (líneas 3-4) o contra GFP (líneas 1-2). B. Los sinaptosomas de médula espinal de rata fueron aislados como se indica en materiales y métodos. Posteriormente fueron tratados con el vehículo (control) o con PMA 1  $\mu$ M (PMA) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente el transportador se inmunoprecipitó usando un anticuerpo contra GLYT1 y se analizó por SDS-PAGE e inmunodetección con un anticuerpo contra ubiquitina (líneas 3-4) o contra GFP (líneas 1-2).

Según los resultados obtenidos, la ubiquitinación en la lisina 619 de GLYT1 actuaba como señal necesaria para que la proteína se endocitara a endosomas tempranos. Una vez en estos compartimentos intracelulares, el transportador podía ser degradado o bien podía ser reciclado a la superficie celular. Como ya se ha descrito en otros trabajos, la separación de las moléculas de ubiquitina unidas a proteínas que se encuentran en endosomas es un proceso necesario para su reciclaje a la membrana plasmática (Komoda, 2008). La deubiquitinación es un proceso por el cual una enzima específica hidroliza los enlaces que unen a una molécula de ubiquitina con la proteína diana o con otra molécula de ubiquitina. Las enzimas que catalizan esta reacción se catalogan como deubiquitininas y dentro de esta clasificación existen varias familias de enzimas en función de su dominio catalítico. Debido a que los resultados de este estudio sugerían que GLYT1 era reciclado constitutivamente a la membrana plasmática desde endosomas tempranos, se quiso averiguar si alguna deubiquitinasa estaba implicada en este proceso. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio indicaban que la enzima UCH L1 estaba implicada en el reciclaje del transportador de glutamato GLT1, mientras que la enzima de la misma familia UCH L3 parecía no tener un papel relevante en la deubiquitinación de esta proteína.

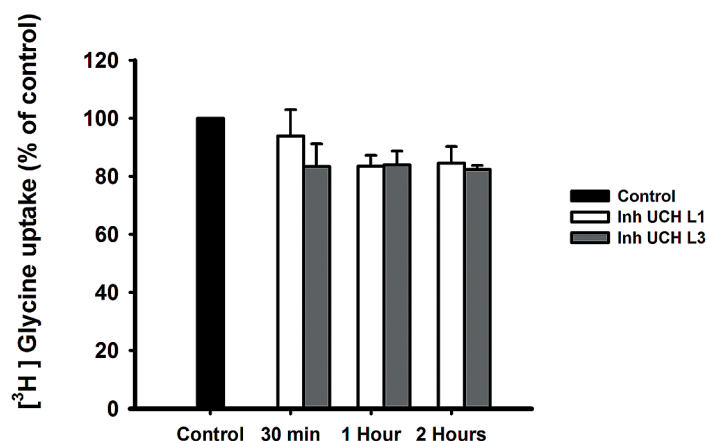
En un ensayo de inmunofluorescencia llevado a cabo en células MDCK transfectadas con GLYT1-YFP, se comprobó si la inhibición de las deubiquitininas UCH L1 y UCH L3 también afectaba al tráfico intracelular del transportador. En este experimento se observó como en comparación con los resultados obtenidos para GLT1, donde se veía que el transportador se acumulaba en compartimentos intracelulares al inhibir la actividad UCH L1 (Fig. 44, A-C), el uso de inhibidores específicos de las deubiquitininas no afectó al patrón de localización de GLYT1 (Fig. 44, D-F). El hecho de que se detectara GLYT1 en la membrana plasmática al inhibir específicamente estas dos enzimas sugería que ninguna de ellas estaba involucrada en la deubiquitinación de GLYT1, ya que en caso contrario el transportador se hubiera detectado en compartimentos intracelulares al estar inhibido su reciclaje a la superficie de la célula.



**Figura 44. Las enzimas UCH L1 o UCH L3 no intervienen en el proceso de endocitosis de GLYT1b.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP o GLT1-YFP. Dos días más tarde se incubaron con el vehículo (A y C) o los inhibidores de las enzimas UCH L1 5  $\mu$ M (B y D) y UCH L3 5  $\mu$ M (C y E). Posteriormente las células se fijaron con PFA al 4% y se analizaron con el microscopio confocal. (Barra de escala 15  $\mu$ m).

Debido a que la enzima UCH L1 se expresa fundamentalmente en el sistema nervioso, se llevo a cabo un ensayo de transporte de [ $^3$ H]glicina en la línea celular C6. Mediante este experimento se quiso comprobar si la inhibición de las deubiquitinasas afectaba la actividad del transportador en células que expresaban GLYT1 de manera endógena. Al igual que ocurrió en el experimento de fluorescencia en células MDCK, la actividad de GLYT1 no se alteró por la inactivación de las deubiquitinasas, sugiriendo que ni la enzima UCH L1, ni la enzima UCH L3, actuaban en la deubiquitinación y reciclaje del transportador (Fig. 45).



**Figura 45. Las enzimas UCH L1 o UCH L3 no intervienen en el proceso de endocitosis de GLYT1b.**

Células MDCK fueron transfectadas con GLYT1b-YFP o GLT1-YFP. Dos días más tarde se incubaron durante 30 minutos, 1 hora o 2 horas, con el vehículo (control) o con los inhibidores de las enzimas UCH L1 5  $\mu$ M y UCH L3 5  $\mu$ M. El transporte de [ $^3$ H]glicina en las células control y en las células incubadas con los inhibidores se analizó como se indica en materiales y métodos. Los datos indican el porcentaje de [ $^3$ H]glicina transportada respecto a los controles y representan la media de tres experimentos por triplicado  $\pm$  S.E.M.

## V. DISCUSIÓN

---



Los transportadores de neurotransmisores dependientes de sodio y cloruro (familia *SLC6*) son proteínas de membrana que desempeñan un importante papel en el sistema nervioso central. Mediante la recaptura de los neurotransmisores, estas proteínas finalizan la señalización neuronal y regulan la intensidad y la duración de la neurotransmisión. La localización precisa de estas proteínas en la superficie celular de neuronas o de células gliales es un proceso altamente regulado que resulta del balance entre la inserción y la retirada de los transportadores de la membrana plasmática. En el sistema nervioso central GLYT1 es el mayor regulador de la concentración de glicina en las sinapsis inhibitoras y en las sinapsis excitatorias. Mediante su acción se regula la excitabilidad de las neuronas glicinérgicas y se modula la señalización mediada por los receptores de glutamato NMDA en neuronas glutamatérgicas. Debido a esta función, es importante conocer los mecanismos que regulan la presencia del transportador en la superficie celular. Por este motivo, en este trabajo se han estudiado los mecanismos de exportación del retículo endoplasmático de GLYT1, así como los procesos que regulan la endocitosis del transportador desde la membrana plasmática.

## V.1 TRÁFICO DE GLYT1 A LA MEMBRANA PLASMÁTICA

El tráfico intracelular hacia la membrana plasmática de los miembros de la familia *SLC6* es un proceso muy regulado que consta de varias etapas. En primer lugar, una vez sintetizados, los transportadores han de pasar un estricto control de calidad en el retículo endoplasmático para poder ser exportados al aparato de Golgi. En estudios anteriores se había descrito que determinadas secuencias en el extremo carboxilo de estas proteínas eran fundamentales para este proceso (Sitte et al., 2004; Olivares et al., 1994; Torres et al., 2003; Farhan et al., 2004; Miranda et al., 2004).

En este trabajo se ha identificado un motivo de exportación del retículo endoplasmático presente en el extremo carboxilo terminal de GLYT1. Este motivo, cuya secuencia es R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>(X)<sub>8</sub>D<sup>585</sup>,

está conservado entre los miembros de la familia *SLC6* y es necesario para la dirigir el transportador a la membrana plasmática, ya que las sustituciones de la Arg<sup>575</sup> y la Leu<sup>576</sup> provocan que el transportador se quede retenido en el retículo endoplasmático. De manera simultánea a este trabajo, se ha descrito que la exportación del transportador de GABA (GAT1) también depende del motivo RL presente en su extremo carboxilo terminal (Farhan et al., 2007). Un resultado similar está descrito también para el transportador de dopamina (DAT), donde la mutación de la Lys<sup>590</sup> (equivalente a la Arg<sup>575</sup> en GLYT1) impide que la proteína alcance la superficie celular (Miranda et al., 2004).

El aminoácido Asp<sup>585</sup> no está tan conservado evolutivamente como el motivo RL, sin embargo, en este trabajo se ha comprobado que este residuo también es importante para la expresión normal de GLYT1. La sustitución de esta posición provoca que el transportador se quede retenido en el retículo endoplasmático, aunque su efecto no es tan drástico como la mutación del motivo RL, ya que una pequeña proporción del transportador es capaz de alcanzar la membrana plasmática. La implicación de esta posición en la salida del retículo endoplasmático también se ha sido descrito para DAT, donde el Asp<sup>600</sup> es necesario para la expresión del transportador en la superficie celular (Miranda et al., 2004). En este estudio también se ha demostrado que esta posición es relevante para la actividad de GLYT2 (Asp<sup>759</sup>), sin embargo, parece no presentar ningún efecto importante en el tráfico intracelular de GAT1 (Asp<sup>576</sup>).

A pesar de que están estrictamente conservados, las mutaciones a alanina de los aminoácidos Gly<sup>569</sup> y la Pro<sup>581</sup> no tienen ningún efecto visible ni en la actividad de transporte, ni en el patrón de expresión de GLYT1. Este hecho contrasta con la mutación equivalente en DAT, donde la sustitución de la Gly<sup>585</sup> provoca la retención del transportador en el retículo endoplasmático (Miranda et al., 2004). Es posible que en GLYT1 la mutación a alanina de estos residuos no sea lo suficientemente perjudicial como para alterar la función de la proteína. Debido a que estos aminoácidos están altamente conservados en los miembros de la familia *SLC6*, sería necesario realizar una investigación en la que se realizaran mutaciones menos conservadoras en estos residuos para ver su implicación en la fisiología del transportador.

La secuencia R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>(X)<sub>3</sub>D<sup>585</sup> se ha identificado como motivo de exportación del retículo endoplasmático de GLYT1 al comprobar que interacciona con Sec24D. A través de esta interacción el transportador es incluido en las vesículas recubiertas de COPII para abandonar el retículo endoplasmático y progresar a lo largo de la vía biosintética. Esta misma observación se describió simultáneamente a la realización de este estudio en GAT1, el cual interacciona con Sec24D a través del motivo RL presente en su extremo carboxilo terminal (Farhan et al., 2007). Es más, se sabe que el motivo de exportación RL de esta proteína es necesario para dirigir al transportador recién sintetizado en el retículo endoplasmático hacia el axón de las neuronas (Reiterer et al., 2008). La descripción de la secuencia R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>(X)<sub>3</sub>D<sup>585</sup> como motivo de exportación no se había descrito hasta ahora, por lo que supone un novedoso mecanismo de interacción entre la familia *SLC6* y el complejo proteico COPII.

En este estudio se ha descrito como este motivo de exportación del retículo endoplasmático de GLYT1 es capaz de dirigir a la membrana plasmática una forma truncada de GLYT2 retenida en el interior celular. Sin embargo, este mismo motivo de exportación no funciona cuando el extremo carboxilo terminal del transportador es trasplantado a una proteína no relacionada. En este caso, el motivo R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>(X)<sub>3</sub>D<sup>585</sup> no es suficiente para promover la llegada a la superficie celular de una forma de la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) retenida en el retículo



endoplasmático. Estos datos indican que, aparte del motivo de exportación RL, en los miembros de la familia *SLC6* deben existir otras secuencias de aminoácidos que también estén implicadas en la interacción con el complejo proteico COPII. La ausencia de estas secuencias complementarias en otras proteínas no relacionadas evolutivamente sería compatible con el hecho de que el motivo de exportación de GLYT1 sólo funcione en miembros de su propia familia. Es más, se sabe que otras señales de exportación descritas tampoco han sido capaces de ser trasplantadas a otras proteínas no relacionadas, lo cual apoya los datos obtenidos.

Ninguno de los motivos de exportación del retículo endoplasmático descritos previamente se asemeja a la secuencia  $R^{575}L^{576}(X_g)D^{585}$  de GLYT1. Sin embargo, en el extremo carboxilo del transportador existen otras sucesiones de aminoácidos que se si pueden ajustar a estos motivos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos  $D^{568}G^{569}D^{570}$  podría ajustarse a un motivo de exportación di-acídico. Sin embargo, se ha demostrado que estos residuos no están implicados en la exportación del transportador, ya que la mutación del Asp<sup>570</sup> no tuvo ningún efecto perjudicial en la llegada de la proteína a la membrana plasmática. Es más, esta secuencia no pudo suplantar al motivo diacídico presente en el extremo carboxilo terminal de la proteína VSVG, cuando el extremo carboxilo de GLYT1 fue acoplado a la forma truncada de la proteína vírica. Por otro lado, el extremo carboxilo terminal de GLYT1 contiene dos motivos di-leucinas que podrían constituir un motivo de exportación di-hidrofóbico. Sin embargo, trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que estos aminoácidos están implicados en la distribución baso-lateral de la proteína en células polarizadas y no en su exportación desde el retículo endoplasmático (Poyatos et al., 2000). Y por último, la sucesión de aminoácidos que forman el motivo RL y la lisina (Lys<sup>577</sup>) que hay a continuación, la cual también se encuentra conservada en GLYT2 y en TAUT, podría considerarse una variante del motivo de exportación di-básico. Sin embargo, se ha demostrado que el mutante K577A no se queda retenido en el retículo endoplasmático y progresa hasta la superficie celular, lo cual descarta a esta secuencia de aminoácidos como motivo de exportación.

Los transportadores retenidos en el retículo endoplasmático como consecuencia de las mutaciones introducidas en el motivo de exportación  $R^{575}L^{576}(X_g)D^{585}$  fueron parcialmente rescatados a la membrana plasmática al co-expresarlos con GLYT1 nativo. Esta observación sugiere que la proteína nativa interacciona con los mutantes en el retículo endoplasmático aportando el motivo de exportación necesario para progresar hasta la superficie celular. Una interacción similar se observó mediante la co-expresión del mutante intracelular F110P (homólogo al mutante de hiperplexia de GLYT2 L269P) con el transportador nativo. En este caso la unión de las proteínas provocó que ambas permanecieran retenidas en el retículo endoplasmático. El motivo por el cual la mutación a Prolina de la Phe<sup>110</sup> provoca que los transportadores permanezcan en el retículo endoplasmático y retengan también al transportador nativo aún no se ha investigado. Sin embargo, el hecho de que una mutación que provoca que el transportador no alcance la superficie celular haya sido encontrada en pacientes de una enfermedad mental, indica la relevancia fisiológica que tiene una concentración adecuada de estas proteínas en la membrana plasmática de las células del sistema nervioso central (Rees et al., 2006).

Aunque la naturaleza de las mutaciones y el resultado de los experimentos de co-expresión de GLYT1 con mutantes sean distintos, en conjunto, estos datos sugieren que el transportador oligomeriza en el retículo endoplasmático. Esta observación es consistente con las conclusiones de otros estudios en los que se describe la oligomerización de determinados miembros de la familia

*SLC6*. En estos trabajos, a través de ensayos bioquímicos o mediante experimentos de microscopia FRET, se concluye que los transportadores DAT, SERT, NET y GAT1 existen como oligómeros no sólo en la membrana plasmática, sino también a lo largo de la vía biosintética de la célula (Sitte et al., 2004; Kilic et al., 2000; Sorkina et al., 2003; Just et al., 2004; Schmid et al. 2001; Farhan et al., 2006). Sin embargo, tanto los resultados de los experimentos de co-expresión de GLYT1 con mutantes, como la oligomerización de otros transportadores de la familia *SLC6* en la superficie celular, contrastan con los resultados publicados en dos estudios diferentes sobre la existencia de oligómeros de GLYT1. Uno de estos trabajos, basado en las propiedades hidrodinámicas de los transportadores de glicina purificados de tallo cerebral de cerdo, concluye que los transportadores de glicina son proteínas monoméricas en su forma nativa en membranas cerebrales (Lopez-Corcuera et al., 1993). Mientras que el otro trabajo, basado en estudios bioquímicos realizados con oocitos de *Xenopus laevis* que expresaban GLYT1 y GLYT2, indica que ambos transportadores funcionan como monómeros en la membrana plasmática, aunque destaca la existencia de formas oligoméricas en el interior celular (Horiuchi et al., 2001).

Debido a esta discrepancia, en este estudio se decidió evaluar de nuevo con mayor profundidad la formación de oligómeros de GLYT1 y su relevancia fisiológica usando dos técnicas distintas: ensayos de microscopia FRET en células transfectadas y experimentos de entrecruzamiento químico en membranas de medula espinal de rata. Los resultados de este trabajo indican que, tanto en células en cultivo, como en sinaptosomas de medula espinal de rata, GLYT1 forma oligómeros en compartimentos intracelulares y débilmente en la membrana plasmática. Estos datos son compatibles con los estudios publicados anteriormente, ya que describen la oligomerización de otro miembro de la familia *SLC6* y confirman que el transportador funciona principalmente como monómero en membranas cerebrales. Sin embargo, la descripción de una pequeña proporción de oligómeros de GLYT1 en la membrana plasmática contradice los datos publicados anteriormente (Lopez-Corcuera et al., 1993; Horiuchi et al., 2001). Esta discrepancia puede deberse a la posible disgregación del bajo porcentaje de oligómeros de GLYT1 durante el proceso de lisis celular. Es más, simultáneamente a este estudio, otro artículo describió la formación de oligómeros de GLYT2, lo cual apoya los resultados obtenidos (Bartholomäus et al., 2008).

En conjunto, todos estos datos parecen indicar que la oligomerización del transportador es necesaria más para el tráfico intracelular de la proteína que para el transporte de glicina. De hecho, la baja proporción de transportador que está formando oligómeros *in vivo* (sólo un 12%) es compatible con esta conclusión. En general, estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la oligomerización de los miembros de la familia *SLC6* es un mecanismo para aumentar la eficiencia en el tráfico intracelular de estas proteínas, ya que la interacción entre los transportadores aproxima varios motivos de exportación a un punto concreto del retículo endoplasmático, facilitando el reconocimiento y la inclusión de estas proteínas en las vesículas recubiertas de COPII (Farhan et al., 2006).

En resumen, nuestros datos indican que la exportación de GLYT1 a la membrana plasmática en un proceso muy regulado que consta de varios pasos. Una vez sintetizado, el transportador es sometido a un estricto control de calidad en el retículo endoplasmático antes de ser exportado al aparato de Golgi. Como se muestra en este trabajo, la oligomerización de GLYT1, así como la interacción con los componentes de del complejo COPII a través de un motivo específico conservado en su extremo carboxilo terminal, son dos procesos necesarios para la exportación del transportador desde retículo endoplasmático.

## V.2 ENDOCITOSIS DE GLYT1

La endocitosis de proteínas es un mecanismo por el cual las células pueden modular la señalización celular mediante la internalización de los receptores y los transportadores implicados en el proceso. Se ha demostrado que la internalización de varios miembros de la familia SLC6 está regulada dinámicamente por el tráfico intracelular de los transportadores y por factores externos (Melikian, 2004). El número de moléculas de GLYT1 en la membrana plasmática de células del sistema nervioso central determina la concentración de glicina en la hendidura sináptica y, por lo tanto, controla la excitabilidad de neuronas inhibitoras glicinérgicas y neuronas excitatorias glutamatérgicas.

En este trabajo se ha demostrado que GLYT1 se endocita tanto constitutivamente como de manera regulada, en respuesta a la activación de la PKC. En ambos casos la ruta mayoritaria de endocitosis parece dependiente de clatrina. Para estudiar la endocitosis constitutiva del transportador se utilizó el ionóforo carboxílico monensina (Basu et al., 1981; Potau et al., 1984; Fournier et al., 2004). El uso de este compuesto reveló que GLYT1 es internalizado constitutivamente a endosomas tempranos. Sin embargo, a pesar de que se ha utilizado en varias investigaciones para observar la endocitosis de proteínas de membrana, este ionóforo puede afectar a otros procesos de tráfico intracelular debido a que disipa los gradientes de sodio y protones de la célula. De este modo, la confirmación de la existencia de una vía de endocitosis constitutiva de GLYT1 se comprobó mediante la utilización de una quimera compuesta por el dominio extracelular y transmembrana del receptor de NGF acoplado a GLYT1.

Estudios anteriores demostraron que GLYT1 se endocita en respuesta a la activación de la PKC, aunque los mecanismos por los que ocurre esto no estaban bien definidos (Gomez et al., 1995; Sato et al., 1995). Para investigar esta endocitosis regulada del transportador se utilizó el éster de forbol PMA. El uso de este compuesto activa la PKC y promueve la endocitosis de GLYT1, tanto en sistemas heterólogos de expresión, como en sistemas que expresan la proteína endógenamente. Recientemente, un estudio ha concluido que en células C6 la regulación de GLYT1 por PMA está mediada principalmente por la PKC $\alpha$  (Morioka et al., 2008),

Mediante el uso de sacarosa hipertónica en el medio se ha comprobado que GLYT1 se internaliza por una vía dependiente de clatrina, tanto en la endocitosis constitutiva del transportador, como en la endocitosis regulada por PKC. Este resultado fue confirmado por el uso de los dominantes negativos de dos proteínas implicadas en la vía de internalización dependientes de clatrina: EPS15 y dinamina 2 (Benmerah et al., 1999). Según un trabajo publicado recientemente, la endocitosis constitutiva y regulada por PKC de DAT también es dependiente de clatrina y dinamina 2, ya que el uso de los ARN de interferencia de ambas proteínas inhiben esta ruta de internalización (Sorkina et al., 2005).

Sin embargo, los resultados de unos experimentos realizados en presencia de filipina sugieren que un 20% del transportador que se internaliza de manera constitutiva lo hace por una vía dependiente de dominios ricos en colesterol, por lo que la vía dependiente de clatrina no sería única por la cual GLYT1 se endocita. De hecho, este mecanismo ha sido descrito para varias proteínas de membrana. Por ejemplo, el receptor de TGF $\beta$  se puede endocitar por una vía dependiente de clatrina o por una vía dependiente de caveolina en función de cuál sea su finalidad (Di

Guglielmo et al., 2003). La endocitosis constitutiva de GLYT1 por una vía independiente de clatrina sería compatible con los resultados obtenidos en un trabajo reciente que afirma que GLYT1 se encuentra en células en cultivo en dominios de membrana ricos en colesterol y esfingolípidos (Liu et al., 2009), aunque para asegurar y definir mejor esta vía de endocitosis y su sentido fisiológico haría falta realizar experimentos más específicos.

Para seleccionar las proteínas que se van a internalizar, una de las secuencias de aminoácidos que reconocen los adaptadores de las cubiertas de clatrina es un motivo dileucinas (Traub, 2009). En el extremo carboxilo terminal de GLYT1 existen dos de estos motivos. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se describió que estos motivos están implicados en el tráfico baso-lateral de la proteína (Poyatos et al., 2000), sin embargo, esta secuencia de aminoácidos parece no estar relacionada con la endocitosis de GLYT1 ya que al mutarla el transportador aun puede ser internalizado.

Otra señal de endocitosis conocida es la ubiquitinación de proteínas de membrana en lisinas citoplasmáticas. Más específicamente, varios transportadores de membrana, como el de dopamina, el de glutamato o el de aminoácidos neutros (SNAT2) dependen de ubiquitina para su internalización regulada por PKC (Sorkina et al., 2005; Hatanaka et al., 2006; González-González et al., 2008). Sin embargo se desconoce si la ubiquitinación está implicada en la endocitosis constitutiva de otros transportadores. Por tanto se decidió estudiar la posible implicación de la ubiquitinación en el tráfico de GLYT1. Este transportador tiene numerosas lisinas orientadas hacia la cara citoplasmática de la proteína, de las que cinco se encuentran en los extremos amino y carboxilo, que suelen ser los puntos más accesibles a las encimas de ubiquitinación. Dos de las lisinas se encuentran en el extremo amino y tres en el carboxilo. El análisis exhaustivo mediante mutagénesis dirigida de estos cinco residuos indica que la lisina 619 de GLYT1 es la más relevante para la endocitosis tanto constitutiva como regulada por PKC. De hecho, se sabe que la redundancia en los sitios de unión de moléculas de ubiquitina es la situación más frecuente en la endocitosis de las proteínas de membrana que utilizan la ubiquitinación como señal para reclutar a la maquinaria proteica de internalización (Miranda et al., 2007). Sin embargo, no se puede descartar la implicación en este proceso de las otras lisinas citoplasmáticas, ya que su mutación también afecta en menor medida a la endocitosis de transportador. De hecho, el mutante sin ninguna lisina intracelular (5KR) se internaliza más lentamente que el mutante K619R, lo cual confirma que el resto de lisinas también son importantes en el proceso de endocitosis del transportador. Es más, en este mutante se ha visto que un 18% de la proteína aun puede de ser endocitada, lo cual indica que no se puede descartar que en algún bucle intracelular de la proteína exista otra lisina que también esté implicada en la regulación de la endocitosis de GLYT1. Sin embargo, este dato también es compatible con la existencia de una vía de internalización alternativa que no dependa de las lisinas. Esta hipótesis concordaría con los resultados obtenidos en los experimentos con filipina, en los cuales se detectó que un 20% de la proteína endocitada constitutivamente lo había hecho por una vía dependiente de dominios de la membrana plasmática ricos en colesterol.

El hecho de que en presencia del dominante negativo de EPS15 se bloquee la endocitosis de GLYT1 es compatible con los resultados obtenidos en los ensayos con los mutantes de las lisinas intracelulares, ya que EPS15 es un adaptador de la cubierta de clatrina encargado de reconocer e interaccionar con las proteínas que han sido ubiquitinadas como señal para su endocitosis (Traub et al., 2009). Aunque la evidencia de que la unión de moléculas de ubiquitina al transportador regula

la internalización constitutiva y mediada por PKC de GLYT1 se obtuvo de un ensayo en el que se uso de la línea celular ts20 (Kulka et al., 1988). En estas células, ambos tipos de endocitosis son bloqueadas cuando se inactivaba por temperaturas restrictivas la enzima iniciadora del proceso de ubiquitinación E1. Estos resultados son compatibles con la inhibición de la internalización de los mutantes sin lisinas intracelulares de GLYT1 y se complementan con experimentos de inmunoprecipitación, mediante los cuales se ha confirmado la unión directa de las moléculas de ubiquitina al transportador. De este modo, tanto en células en cultivo, como en sistemas que expresan la proteína de manera endógena, se ha comprobado que el transportador es ubiquitinado y que la cantidad de ubiquitina que se incorpora a él aumenta con la activación de la PKC. Es más, a través de un experimento con unas condiciones desnaturizantes fuertes para evitar los posibles contaminantes de una inmunoprecipitación, se ha concluido que el aumento de la ubiquitinación de GLYT1 observado tras el tratamiento con PMA es dependiente de las lisinas intracelulares. Sin embargo, debido a que la presencia de ubiquitina en el inmunoprecipitado de GLYT1 en condiciones basales presenta una señal débil, la relevancia de cada una de las lisinas intracelulares en la ubiquitinación del transportador no ha podido ser medida por esta técnica.

La unión de moléculas de ubiquitina a proteínas de membrana en respuesta a la activación de la PKC se ha descrito en varios estudios (Miranda et al., 2005; Sorkina et al., 2005; González-González et al., 2008). Sin embargo, la importancia de este proceso en la endocitosis constitutiva es poco conocida. La estabilidad durante horas que presenta GLYT1 en presencia de cicloheximida y su rápida internalización a endosomas tempranos observada en los experimentos con la quimera del transportador unido al extremo extracelular y transmembrana del receptor de NGF, parecen indicar que GLYT1 no permanece estable en la membrana plasmática, sino que el transportador que se endocita constitutivamente vuelve a la superficie celular en un proceso de reciclaje. Esta observación es compatible con la co-localización del transportador con receptor de transferrina, un marcador de los endosomas de reciclaje. El estado estacionario de la distribución de una determinada proteína de membrana viene dado por el balance entre los porcentajes de esa proteína en compartimentos intracelulares y los porcentajes en la superficie celular. Por lo que la rápida internalización de las quimeras, así como el hecho de que en células control, sin ningún tratamiento, GLYT1 sólo se detecte en la membrana plasmática, sugieren que el reciclaje del transportador desde y hacia la superficie celular es un proceso rápido. En otros trabajos publicados se ha descrito que los transportadores GAT1 y DAT (Deken et al., 2003; Li et al., 2004) también están sometidos a un rápido proceso de reciclaje constitutivo, aunque no se ha comprobado si la ubiquitinación de estas proteínas está implicada en el proceso.

La dependencia común de la lisina 619 en la internalización constitutiva y regulada por PKC del transportador pone de manifiesto que la unión de moléculas de ubiquitina a este residuo está implicada en ambos procesos. Sin embargo, esta coincidencia contrasta con la mayor cantidad de ubiquitina unida al transportador tras el tratamiento con PMA. Según los datos de los ensayos de inmunoprecipitación, la activación de la PKC aumenta la unión de moléculas de ubiquitina a GLYT1 en un proceso que es dependiente de las lisinas intracelulares. Una explicación para el aumento en la ubiquitinación del transportador sería que, en condiciones basales, las lisinas que son ubiquitinadas en respuesta al tratamiento con PMA estuvieran parcialmente ocultas. De este modo, estos residuos sólo serían accesibles a las ubiquitin ligasas tras un cambio conformacional del transportador promovido por la activación de la PKC. La rápida endocitosis constitutiva y no estimulada por PMA de la quimera NG1ct-wt (compuesta por el extremo carboxilo de GLYT1 fusionado al



dominio extracelular y transmembrana del receptor de NGF) es consistente con esta idea, ya que al tener todas sus lisinas citoplasmáticas expuestas la velocidad a la que es internalizada es similar a la del transportador completo en presencia de PMA. Otro resultado que es compatible con esta teoría es el hecho de que la endocitosis regulada por PMA del resto de los mutantes de las lisinas citoplasmáticas sea más lenta que su endocitosis constitutiva, lo cual indica que estos residuos en menor medida también están implicados en este proceso.

La diferente manera en que GLYT1 es ubiquitinado tras la activación de la PKC podría ser el motivo por el cual, en vez de ser reciclado a la membrana plasmática, se dirige a degradación al transportador endocitado tras el tratamiento con PMA. Este hecho podría explicarse por la existencia de dos desubiquitinasas distintas que fueran capaces de distinguir entre el patrón de ubiquitinación del transportador en condiciones basales y el patrón de ubiquitinación tras el tratamiento con PMA una vez que el transportador ha sido endocitado a los endosomas tempranos. Este mecanismo de regulación se ha descrito para el receptor de EFG (Epidermal Growth Factor) (Komoda, 2008). Cuando esta proteína ha sido endocitada en respuesta a la unión de su ligando existen dos deubiquitinasas que se unen a ella a través de un adaptador: AMSH y UBPY. La primera enzima, AMSH, está implicada en el reciclaje del receptor a la membrana plasmática (McCullough et al., 2004), mientras que la segunda, UBPY, está implicada en su degradación (Alwan et al., 2007). Cada una de ellas reconoce un patrón de ubiquitinación distinto, por lo que en función de cómo sea ubiquitinado el receptor, la proteína es degradada o reciclada a la membrana plasmática. La existencia de un sistema de desubiquitinación eficiente de GLYT1 es consistente con el rápido reciclaje a la membrana plasmática de la proteína y explicaría la baja señal de ubiquitinación que presenta el transportador en condiciones basales en los ensayos de inmunoprecipitación. En nuestro laboratorio, se ha comprobado que la enzima UCH L1 está implicada en la deubiquitinación y el tráfico intracelular del transportador de glutamato GLT1 (datos no publicados). Sin embargo, ni la UCH L1, ni la UCH L3 parecen estar implicadas en el proceso de reciclaje de GLYT1 a la membrana plasmática, por lo que las posibles enzimas que promueven la degradación y el retorno de la proteína a la superficie celular aun no se ha identificado.

La ubiquitin ligasa responsable de la modificación de GLYT1 todavía no se ha identificado, aunque es muy probable que los dos tipos de internalización del transportador estén regulados por dos enzimas E3 distintas. Así, es probable que una ubiquitin ligasa sea la encargada de ubiquitinar al transportador en condiciones basales, mientras que otra ubiquitin ligasa distinta sea la responsable de la ubiquitinación de GLYT1 tras la activación de la PKC. Según datos de nuestro laboratorio, la ubiquitin ligasa Nedd4-2 está relacionada con la ubiquitinación del transportador de glutamato GLT1 (no publicado). Esta enzima E3 se ha descrito que también está implicada en la ubiquitinación de DAT (Sorkina et al., 2006), sin embargo, una aproximación preliminar realizada en otro estudio en nuestro laboratorio sugiere que esta proteína no afecta a la endocitosis de GLYT1.

Tampoco se sabe si la fosforilación directa del transportador se requiere para la endocitosis mediada por PMA, debido a que mutantes de la proteína sin los sitios consenso de fosforilación de la PKC pueden ser endocitados (Sato et al., 1995). Una posible explicación a este hecho sería que la fosforilación ocurriera sobre un aminoácido distinto al de los motivos consenso. Aunque otra posibilidad sería que la PKC fosforilara alguna proteína implicada en el proceso de ubiquitinación del transportador. Una de las proteínas que podría fosforilar la PKC en ese caso serían los adaptadores de las ubiquitin ligasas o las propias ubiquitin ligasas (Leon et al., 2009). Este mecanismo de



regulación de la endocitosis mediada por ubiquitinación se ha descrito para el receptor de células T (TCR). Para que esta proteína se internalice es necesario que se una a ella el adaptador ZAP-70, el cual necesita ser fosforilado para reclutar a la ubiquitin ligasa Cbl (Lupher Jr et al., 1997; Wang et al., 2001). La relación entre la ubiquitinación y la fosforilación por PKC tampoco están muy clara en DAT, ya que la eliminación de los sitios consenso de fosforilación en esta proteína no impiden su internalización (Granás et al., 2003). Tampoco en GLT1 se descubrió el papel de la fosforilación en su endocitosis mediada por ubiquitinación, por lo que la relación entre la activación de la PKC, la ubiquitinación y la endocitosis de los transportadores aun no está clara (Sheldon et al., 2008; González-González et al., 2008).

En resumen, todos estos resultados indican que GLYT1 se endocita constitutivamente desde la membrana plasmática a endosomas de reciclaje y que este proceso se acelera mediante la activación de la PKC. Los datos sugieren que el transportador se endocita mayoritariamente por una vía dependiente de clatrina en ambos tipos de internalización, la constitutiva y la regulada, aunque un pequeño porcentaje de la proteína endocitada constitutivamente lo hace por una vía dependiente de dominios de membrana ricos en colesterol. En este trabajo también se ha demostrado que ambos tipos de endocitosis dependen de las lisinas intracelulares, especialmente la lisina 619. Por último, nuestros datos indican que GLYT1 se ubiquitina en condiciones basales y que dicha ubiquitinación aumenta mediante la activación de la PKC en un proceso también dependiente de las lisinas citoplasmáticas.



## VI. CONCLUSIONES

---



1. La secuencia de aminoácidos R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>[X<sub>8</sub>]D<sup>585</sup> presente en el extremo carboxilo terminal de GLYT1 es un motivo de exportación del retículo endoplasmático conservado en los miembros de la familia *SLC6*. Esta secuencia está implicada en la interacción del transportador con la proteína Sec24D, un componente del complejo COPII.
2. GLYT1 forma oligómeros a lo largo de la vía biosintética de la célula y débilmente en la membrana plasmática.
3. GLYT1 es endocitado constitutivamente a endosomas de reciclaje mayoritariamente por una vía dependiente de clatrina. La activación de la PKC acelera este proceso y promueve la degradación del transportador.
4. La endocitosis constitutiva y regulada por PKC de GLYT1 dependen de las lisinas de los extremos citoplasmáticos del transportador. La lisina 619 presente en el extremo carboxilo terminal es la más importante en ambos procesos.
5. La internalización constitutiva y regulada por PKC de GLYT1 dependen de la ubiquitinación del transportador. La incorporación de moléculas de ubiquitina a GLYT1 aumenta mediante la activación de la PKC en un proceso en el que están implicadas las lisinas de los extremos citoplasmáticos.





## VII. RESUMEN

---



Glycine is an inhibitory neurotransmitter that is mainly active in the caudal areas of the CNS. Moreover, glycine also participates in excitatory neurotransmission since it is a co-agonist of the NMDA subtype of glutamate receptors. The glycine transporter GLYT1 regulates both glycinergic and glutamatergic neurotransmission by controlling the reuptake of glycine at synapses. The number of GLYT1 molecules at the surface of neurons determines the efficiency of glycine clearance in the brain. The surface levels of GLYT1 depend on the rates of anterograde transport of the newly synthesized GLYT1 from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane and are also acutely regulated by the transporter internalization from the cell surface. However, the molecular mechanisms that control the endocytotic trafficking of the transporter and the mechanisms that control the endoplasmic reticulum export of the protein are not well defined.

In this study we have investigated the export of GLYT1 from the endoplasmic reticulum, showing the conservation of the export mechanisms along the NSS family. Through a mutational analysis, we have identified the evolutionary conserved motif R<sup>575</sup>L<sup>576</sup>(X)<sup>585</sup>D<sup>588</sup> as an endoplasmic reticulum export signal in the C-terminus of GLYT1. This signal might be involved in the recruitment of the COPII component Sec24D. In addition, by using FRET microscopy in living cells, we show that GLYT1 can form oligomers along the trafficking pathway that it follows to the plasma membrane, similarly to that described for other members of this transporter family.

Also, in this study we have investigated the constitutive and regulated endocytosis of GLYT1. We have shown that GLYT1b is endocytosed through a clathrin-dependent mechanism, a process that is accelerated by phorbol esters. Through a mutational analysis, we have identified a lysine residue in the C-terminal tail of the protein as the major determinant for GLYT1b internalization through both constitutive and PMA stimulated pathways. Ubiquitination GLYT1b is stimulated by PMA, a finding compatible with ubiquitin being the platform on which the clathrin network is assembled.



## VIII. BIBLIOGRAFIA

---





- Adams, R. H., Sato, K., Shimada, S., Tohyama, M., Puschel, A. W., and Betz, H. (1995). Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *J Neurosci* 15(3 Pt 2), 2524-32.
- Alwan, H. A., and van Leeuwen, J. E. (2007). UBPY-mediated epidermal growth factor receptor (EGFR) de-ubiquitination promotes EGFR degradation. *J Biol Chem* 282(3), 1658-69.
- Aragon, C., and Lopez-Corcuera, B. (1998). Purification, hydrodynamic properties, and glycosylation analysis of glycine transporters. *Methods Enzymol* 296, 3-17.
- Aragon, M. C., Gimenez, C., and Mayor, F. (1987). Stoichiometry of sodium- and chloride-coupled glycine transport in synaptic plasma membrane vesicles derived from rat brain. *FEBS Lett* 212(1), 87-90.
- Aubrey, K. R., Mitrovic, A. D., and Vandenberg, R. J. (2000). Molecular basis for proton regulation of glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *Mol Pharmacol* 58(1), 129-35.
- Aubrey, K. R., Vandenberg, R. J., and Clements, J. D. (2005). Dynamics of forward and reverse transport by the glial glycine transporter, glyt1b. *Biophys J* 89(3), 1657-68.
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* 13(6), 295-300.
- Barriere, H., Nemes, C., Lechardeur, D., Khan-Mohammad, M., Fruh, K., and Lukacs, G. L. (2006). Molecular basis of oligoubiquitin-dependent internalization of membrane proteins in Mammalian cells. *Traffic* 7(3), 282-97.

- Bartholomaeus, I., Milan-Lobo, L., Nicke, A., Dutertre, S., Hastrup, H., Jha, A., Gether, U., Sitte, H. H., Betz, H., and Eulenburg, V. (2008). Glycine transporter dimers: evidence for occurrence in the plasma membrane. *J Biol Chem* 283(16), 10978-91.
- Basu, S. K., Goldstein, J. L., Anderson, R. G., and Brown, M. S. (1981). Monensin interrupts the recycling of low density lipoprotein receptors in human fibroblasts. *Cell* 24(2), 493-502.
- Benmerah, A., Bayrou, M., Cerf-Bensussan, N., and Dautry-Varsat, A. (1999). Inhibition of clathrin-coated pit assembly by an Eps15 mutant. *J Cell Sci* 112 ( Pt 9), 1303-11.
- Benveniste, M., and Mayer, M. L. (1991). Structure-activity analysis of binding kinetics for NMDA receptor competitive antagonists: the influence of conformational restriction. *Br J Pharmacol* 104(1), 207-21.
- Berger, S. P., Farrell, K., Conant, D., Kempner, E. S., and Paul, S. M. (1994). Radiation inactivation studies of the dopamine reuptake transporter protein. *Mol Pharmacol* 46(4), 726-31.
- Bergeron, R., Meyer, T. M., Coyle, J. T., and Greene, R. W. (1998). Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15730-4.
- Betz, H., Gomeza, J., Armsen, W., Scholze, P., and Eulenburg, V. (2006). Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 1), 55-8.
- Bickford, L. C., Mossessova, E., and Goldberg, J. (2004). A structural view of the COPII vesicle coat. *Curr Opin Struct Biol* 14(2), 147-53.
- Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361(6407), 31-9.
- Borowsky, B., and Hoffman, B. J. (1998). Analysis of a gene encoding two glycine transporter variants reveals alternative promoter usage and a novel gene structure. *J Biol Chem* 273(44), 29077-85.
- Borowsky, B., Mezey, E., and Hoffman, B. J. (1993). Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene. *Neuron* 10(5), 851-63.
- Budnik, A., and Stephens, D. J. (2009). ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett* 583(23), 3796-803.
- Butterworth, M. B., Edinger, R. S., Ovaa, H., Burg, D., Johnson, J. P., and Frizzell, R. A. (2007). The deubiquitinating enzyme UCH-L3 regulates the apical membrane recycling of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem* 282(52), 37885-93.
- Caruso, D. M., Owczarzak, M. T., and Pourcho, R. G. (1990). Colocalization of substance P and GABA in retinal ganglion cells: a computer-assisted visualization. *Vis Neurosci* 5(4), 389-94.
- Chen, L., Muhlhauser, M., and Yang, C. R. (2003). Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol* 89(2), 691-703.

- Cherubino, F., Bossi, E., Miszner, A., Ghezzi, C., and Peres, A. Transient currents in the glycine cotransporter GlyT1 reveal different steps in transport mechanism. *J Mol Neurosci* 41(2), 243-51.
- Clements, J. D., and Westbrook, G. L. (1991). Activation kinetics reveal the number of glutamate and glycine binding sites on the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuron* 7(4), 605-13.
- Cubelos, B., Gimenez, C., and Zafra, F. (2005a). Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 15(4), 448-59.
- Cubelos, B., Gimenez, C., and Zafra, F. (2005b). The glycine transporter GLYT1 interacts with Sec3, a component of the exocyst complex. *Neuropharmacology* 49(6), 935-44.
- Cubelos, B., Gonzalez-Gonzalez, I. M., Gimenez, C., and Zafra, F. (2005). The scaffolding protein PSD-95 interacts with the glycine transporter GLYT1 and impairs its internalization. *J Neurochem* 95(4), 1047-58.
- d'Azzo, A., Bongiovanni, A., and Nastasi, T. (2005). E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic* 6(6), 429-41.
- Deken, S. L., Wang, D., and Quick, M. W. (2003). Plasma membrane GABA transporters reside on distinct vesicles and undergo rapid regulated recycling. *J Neurosci* 23(5), 1563-8.
- Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., and Wrana, J. L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5(5), 410-21.
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51(1), 7-61.
- Dohi, T., Morita, K., Kitayama, T., Motoyama, N., and Morioka, N. (2009). Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain. *Pharmacol Ther* 123(1), 54-79.
- Dominguez, M., Dejgaard, K., Fullekrug, J., Dahan, S., Fazel, A., Paccaud, J. P., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J., and Nilsson, T. (1998). gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer. *J Cell Biol* 140(4), 751-65.
- Ebihara, S., Yamamoto, T., Obata, K., and Yanagawa, Y. (2004). Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2. *Biochem Biophys Res Commun* 317(3), 857-64.
- Farhan, H., Freissmuth, M., and Sitte, H. H. (2006). Oligomerization of neurotransmitter transporters: a ticket from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane. *Handb Exp Pharmacol*(175), 233-49.
- Farhan, H., Korkhov, V. M., Paulitschke, V., Dorostkar, M. M., Scholze, P., Kudlacek, O., Freissmuth, M., and Sitte, H. H. (2004). Two discontinuous segments in the carboxyl terminus are required for membrane targeting of the rat gamma-aminobutyric acid transporter-1 (GAT1). *J Biol Chem* 279(27), 28553-63.
- Farhan, H., Reiterer, V., Korkhov, V. M., Schmid, J. A., Freissmuth, M., and Sitte, H. H. (2007). Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D. *J Biol Chem* 282(10), 7679-89.

- Fedele, E., and Foster, A. C. (1992). [3H]glycine uptake in rat hippocampus: kinetic analysis and autoradiographic localization. *Brain Res* 572(1-2), 154-63.
- Feige, J. N., Sage, D., Wahli, W., Desvergne, B., and Gelman, L. (2005). PixFRET, an ImageJ plug-in for FRET calculation that can accommodate variations in spectral bleed-throughs. *Microsc Res Tech* 68(1), 51-8.
- Fernandez-Sanchez, E., Diez-Guerra, F. J., Cubelos, B., Gimenez, C., and Zafra, F. (2008). Mechanisms of endoplasmic-reticulum export of glycine transporter-1 (GLYT1). *Biochem J* 409(3), 669-81.
- Fernandez-Sanchez, E., Martinez-Villarreal, J., Gimenez, C., and Zafra, F. (2009). Constitutive and regulated endocytosis of the glycine transporter GLYT1b is controlled by ubiquitination. *J Biol Chem* 284(29), 19482-92.
- Fornes, A., Nunez, E., Aragon, C., and Lopez-Corcuera, B. (2004). The second intracellular loop of the glycine transporter 2 contains crucial residues for glycine transport and phorbol ester-induced regulation. *J Biol Chem* 279(22), 22934-43.
- Forrest, L. R., Tavoulari, S., Zhang, Y. W., Rudnick, G., and Honig, B. (2007). Identification of a chloride ion binding site in Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31), 12761-6.
- Fournier, K. M., Gonzalez, M. I., and Robinson, M. B. (2004). Rapid trafficking of the neuronal glutamate transporter, EAAC1: evidence for distinct trafficking pathways differentially regulated by protein kinase C and platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 279(33), 34505-13.
- Gabernet, L., Pauly-Evers, M., Schwerdel, C., Lentz, M., Bluethmann, H., Vogt, K., Alberati, D., Mohler, H., and Boison, D. (2005). Enhancement of the NMDA receptor function by reduction of glycine transporter-1 expression. *Neurosci Lett* 373(1), 79-84.
- Geerlings, A., Lopez-Corcuera, B., and Aragon, C. (2000). Characterization of the interactions between the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 and the SNARE protein syntaxin 1A. *FEBS Lett* 470(1), 51-4.
- Geerlings, A., Nunez, E., Lopez-Corcuera, B., and Aragon, C. (2001). Calcium- and syntaxin 1-mediated trafficking of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 276(20), 17584-90.
- Genedani, S., Guidolin, D., Leo, G., Filaferro, M., Torvinen, M., Woods, A. S., Fuxe, K., Ferre, S., and Agnati, L. F. (2005). Computer-assisted image analysis of caveolin-1 involvement in the internalization process of adenosine A2A-dopamine D2 receptor heterodimers. *J Mol Neurosci* 26(2-3), 177-84.
- Giraud, C. G., and Maccioni, H. J. (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol Biol Cell* 14(9), 3753-66.
- Gomez, J., Hulsman, S., Ohno, K., Eulenburg, V., Szoke, K., Richter, D., and Betz, H. (2003a). Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 40(4), 785-96.

- Gomez, J., Ohno, K., Hulsmann, S., Arnsen, W., Eulenburg, V., Richter, D. W., Laube, B., and Betz, H. (2003b). Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 40(4), 797-806.
- Gomez, J., Zafra, F., Olivares, L., Gimenez, C., and Aragon, C. (1995). Regulation by phorbol esters of the glycine transporter (GLYT1) in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 1233(1), 41-6.
- Gonzalez, M. I., Krizman-Genda, E., and Robinson, M. B. (2007). Caveolin-1 regulates the delivery and endocytosis of the glutamate transporter, excitatory amino acid carrier 1. *J Biol Chem* 282(41), 29855-65.
- Gonzalez-Gonzalez, I. M., Garcia-Tardon, N., Gimenez, C., and Zafra, F. (2008). PKC-dependent endocytosis of the GLT1 glutamate transporter depends on ubiquitylation of lysines located in a C-terminal cluster. *Glia* 56(9), 963-74.
- Granas, C., Ferrer, J., Loland, C. J., Javitch, J. A., and Gether, U. (2003). N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization. *J Biol Chem* 278(7), 4990-5000.
- Guastella, J., Brecha, N., Weigmann, C., Lester, H. A., and Davidson, N. (1992). Cloning, expression, and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(15), 7189-93.
- Haas, K. F., and Broadie, K. (2008). Roles of ubiquitination at the synapse. *Biochim Biophys Acta* 1779(8), 495-506.
- Hanzal-Bayer, M. F., and Hancock, J. F. (2007). Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* 581(11), 2098-104.
- Hastrup, H., Karlin, A., and Javitch, J. A. (2001). Symmetrical dimer of the human dopamine transporter revealed by cross-linking Cys-306 at the extracellular end of the sixth transmembrane segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18), 10055-60.
- Hatanaka, T., Hatanaka, Y., and Setou, M. (2006). Regulation of amino acid transporter ATA2 by ubiquitin ligase Nedd4-2. *J Biol Chem* 281(47), 35922-30.
- Heilker, R., Spiess, M., and Crottet, P. (1999). Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* 21(7), 558-67.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-79.
- Horiuchi, M., Nicke, A., Gomez, J., Aschrafi, A., Schmalzing, G., and Betz, H. (2001). Surface-localized glycine transporters 1 and 2 function as monomeric proteins in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(4), 1448-53.
- Javitt, D. C. (2009). Glycine transport inhibitors for the treatment of schizophrenia: symptom and disease modification. *Curr Opin Drug Discov Devel* 12(4), 468-78.
- Jess, U., Betz, H., and Schloss, P. (1996). The membrane-bound rat serotonin transporter, SERT1, is an oligomeric protein. *FEBS Lett* 394(1), 44-6.

- Johnston, G. A., and Iversen, L. L. (1971). Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. *J Neurochem* 18(10), 1951-61.
- Ju, P., Aubrey, K. R., and Vandenberg, R. J. (2004). Zn<sup>2+</sup> inhibits glycine transport by glycine transporter subtype 1b. *J Biol Chem* 279(22), 22983-91.
- Juge, N., Muroyama, A., Hiasa, M., Omote, H., and Moriyama, Y. (2009). Vesicular inhibitory amino acid transporter is a Cl<sup>-</sup>/gamma-aminobutyrate Co-transporter. *J Biol Chem* 284(50), 35073-8.
- Jursky, F., and Nelson, N. (1995). Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. *J Neurochem* 64(3), 1026-33.
- Just, H., Sitte, H. H., Schmid, J. A., Freissmuth, M., and Kudlacek, O. (2004). Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *J Biol Chem* 279(8), 6650-7.
- Kemp, J. A., and Leeson, P. D. (1993). The glycine site of the NMDA receptor--five years on. *Trends Pharmacol Sci* 14(1), 20-5.
- Kilic, F., and Rudnick, G. (2000). Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7), 3106-11.
- Kim, K. M., Kingsmore, S. F., Han, H., Yang-Feng, T. L., Godinot, N., Seldin, M. F., Caron, M. G., and Giros, B. (1994). Cloning of the human glycine transporter type 1: molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes. *Mol Pharmacol* 45(4), 608-17.
- Kinney, G. G., Sur, C., Burno, M., Mallorga, P. J., Williams, J. B., Figueroa, D. J., Wittmann, M., Lemaire, W., and Conn, P. J. (2003). The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J Neurosci* 23(20), 7586-91.
- Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B., and Betz, H. (1991). The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266(33), 22242-5.
- Kitayama, S., Ikeda, T., Mitsuhashi, C., Sato, T., Morita, K., and Dohi, T. (1999). Dominant negative isoform of rat norepinephrine transporter produced by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* 274(16), 10731-6.
- Kolling, R., and Hollenberg, C. P. (1994). The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J* 13(14), 3261-71.
- Komada, M. (2008). Controlling receptor downregulation by ubiquitination and deubiquitination. *Curr Drug Discov Technol* 5(1), 78-84.
- Kuhar, M. J., and Zarbin, M. A. (1978). Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds. *J Neurochem* 31(1), 251-6.



- Kulka, R. G., Raboy, B., Schuster, R., Parag, H. A., Diamond, G., Ciechanover, A., and Marcus, M. (1988). A Chinese hamster cell cycle mutant arrested at G2 phase has a temperature-sensitive ubiquitin-activating enzyme, E1. *J Biol Chem* 263(30), 15726-31.
- Leon, S., and Haguenauer-Tsapis, R. (2009). Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Exp Cell Res* 315(9), 1574-83.
- Lerma, J., Zukin, R. S., and Bennett, M. V. (1990). Glycine decreases desensitization of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors expressed in *Xenopus* oocytes and is required for NMDA responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6), 2354-8.
- Li, L. B., Chen, N., Ramamoorthy, S., Chi, L., Cui, X. N., Wang, L. C., and Reith, M. E. (2004). The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J Biol Chem* 279(20), 21012-20.
- Liu, Q. R., Lopez-Corcuera, B., Mandiyan, S., Nelson, H., and Nelson, N. (1993). Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 268(30), 22802-8.
- Liu, X., Mitrovic, A. D., and Vandenberg, R. J. (2009). Glycine transporter 1 associates with cholesterol-rich membrane raft microdomains. *Biochem Biophys Res Commun* 384(4), 530-4.
- Logan, W. J., and Snyder, S. H. (1972). High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res* 42(2), 413-31.
- Lopez-Corcuera, B., Alcantara, R., Vazquez, J., and Aragon, C. (1993). Hydrodynamic properties and immunological identification of the sodium- and chloride-coupled glycine transporter. *J Biol Chem* 268(3), 2239-43.
- Lopez-Corcuera, B., Martinez-Maza, R., Nunez, E., Roux, M., Supplisson, S., and Aragon, C. (1998). Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J Neurochem* 71(5), 2211-9.
- Lupher, M. L., Jr., Songyang, Z., Shoelson, S. E., Cantley, L. C., and Band, H. (1997). The Cbl phosphotyrosine-binding domain selects a D(N/D)XpY motif and binds to the Tyr292 negative regulatory phosphorylation site of ZAP-70. *J Biol Chem* 272(52), 33140-4.
- Luque, J. M., Nelson, N., and Richards, J. G. (1995). Cellular expression of glycine transporter 2 messenger RNA exclusively in rat hindbrain and spinal cord. *Neuroscience* 64(2), 525-35.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y. F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291(5502), 316-9.
- Martinez-Maza, R., Poyatos, I., Lopez-Corcuera, B., E. N. u., Gimenez, C., Zafra, F., and Aragon, C. (2001). The role of N-glycosylation in transport to the plasma membrane and sorting of the neuronal glycine transporter GLYT2. *J Biol Chem* 276(3), 2168-73.
- Mayer, M. L., and Westbrook, G. L. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 394, 501-27.

- Mayor, F., Jr., Marvizon, J. G., Aragon, M. C., Gimenez, C., and Valdivieso, F. (1981). Glycine transport into plasma-membrane vesicles derived from rat brain synaptosomes. *Biochem J* 198(3), 535-41.
- Mayor, S., and Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(8), 603-12.
- McCullough, J., Clague, M. J., and Urbe, S. (2004). AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase. *J Cell Biol* 166(4), 487-92.
- Melikian, H. E. (2004). Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. *Pharmacol Ther* 104(1), 17-27.
- Melikian, H. E., and Buckley, K. M. (1999). Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J Neurosci* 19(18), 7699-710.
- Mellerup, E. T., Plenge, P., and Nielsen, M. (1984). Size determination of binding polymers for [3H]imipramine and [3H]paroxetine in human platelet membranes. *Eur J Pharmacol* 106(2), 411-3.
- Miranda, M., Dionne, K. R., Sorkina, T., and Sorkin, A. (2007). Three ubiquitin conjugation sites in the amino terminus of the dopamine transporter mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol Biol Cell* 18(1), 313-23.
- Miranda, M., and Sorkin, A. (2007). Regulation of receptors and transporters by ubiquitination: new insights into surprisingly similar mechanisms. *Mol Interv* 7(3), 157-67.
- Miranda, M., Sorkina, T., Grammatopoulos, T. N., Zawada, W. M., and Sorkin, A. (2004). Multiple molecular determinants in the carboxyl terminus regulate dopamine transporter export from endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279(29), 30760-70.
- Miranda, M., Wu, C. C., Sorkina, T., Korstjens, D. R., and Sorkin, A. (2005). Enhanced ubiquitylation and accelerated degradation of the dopamine transporter mediated by protein kinase C. *J Biol Chem* 280(42), 35617-24.
- Morioka, N., Abidin, J. M., Morita, K., Kitayama, T., Nakata, Y., and Dohi, T. (2008). The regulation of glycine transporter GLYT1 is mainly mediated by protein kinase Calpha in C6 glioma cells. *Neurochem Int* 53(6-8), 248-54.
- Mulder, A. H., and Snyder, S. H. (1974). Potassium-induced release of amino acids from cerebral cortex and spinal cord slices of the rat. *Brain Res* 76(2), 297-308.
- Nagy, A., and Delgado-Escueta, A. V. (1984). Rapid preparation of synaptosomes from mammalian brain using nontoxic isoosmotic gradient material (Percoll). *J Neurochem* 43(4), 1114-23.
- Nguyen, A. W., and Daugherty, P. S. (2005). Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET. *Nat Biotechnol* 23(3), 355-60.
- Nishimura, N., and Balch, W. E. (1997). A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum. *Science* 277(5325), 556-8.

- Nong, Y., Huang, Y. Q., Ju, W., Kalia, L. V., Ahmadian, G., Wang, Y. T., and Salter, M. W. (2003). Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 422(6929), 302-7.
- Norgaard-Nielsen, K., Norregaard, L., Hastrup, H., Javitch, J. A., and Gether, U. (2002). Zn(2+) site engineering at the oligomeric interface of the dopamine transporter. *FEBS Lett* 524(1-3), 87-91.
- Nufer, O., Guldbrandsen, S., Degen, M., Kappeler, F., Paccaud, J. P., Tani, K., and Hauri, H. P. (2002). Role of cytoplasmic C-terminal amino acids of membrane proteins in ER export. *J Cell Sci* 115(Pt 3), 619-28.
- Olivares, L., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1994). Carboxyl terminus of the glycine transporter GLYT1 is necessary for correct processing of the protein. *J Biol Chem* 269(45), 28400-4.
- Olivares, L., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1995). The role of N-glycosylation in the targeting and activity of the GLYT1 glycine transporter. *J Biol Chem* 270(16), 9437-42.
- Pearlman, R. J., Aubrey, K. R., and Vandenberg, R. J. (2003). Arachidonic acid and anandamide have opposite modulatory actions at the glycine transporter, GLYT1a. *J Neurochem* 84(3), 592-601.
- Ponce, J., Poyatos, I., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1998). Characterization of the 5' region of the rat brain glycine transporter GLYT2 gene: identification of a novel isoform. *Neurosci Lett* 242(1), 25-8.
- Potau, N., Bailey, A. C., Roach, E., Williams, J. A., and Goldfine, I. D. (1984). Methylamine and monensin do not block insulin internalization but do influence the intracellular distribution and action of insulin in pancreatic acini from diabetic mice. *Endocrinology* 115(1), 205-13.
- Poyatos, I., Ponce, J., Aragon, C., Gimenez, C., and Zafra, F. (1997). The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 49(1-2), 63-70.
- Poyatos, I., Ruberti, F., Martinez-Maza, R., Gimenez, C., Dotti, C. G., and Zafra, F. (2000). Polarized distribution of glycine transporter isoforms in epithelial and neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* 15(1), 99-111.
- Praefcke, G. J., and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2), 133-47.
- Rees, M. I., Harvey, K., Pearce, B. R., Chung, S. K., Duguid, I. C., Thomas, P., Beatty, S., Graham, G. E., Armstrong, L., Shiang, R., Abbott, K. J., Zuberi, S. M., Stephenson, J. B., Owen, M. J., Tijssen, M. A., van den Maagdenberg, A. M., Smart, T. G., Supplisson, S., and Harvey, R. J. (2006). Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 38(7), 801-6.
- Reiterer, V., Maier, S., Sitte, H. H., Kriz, A., Ruegg, M. A., Hauri, H. P., Freissmuth, M., and Farhan, H. (2008). Sec24- and ARFGAP1-dependent trafficking of GABA transporter-1 is a prerequisite for correct axonal targeting. *J Neurosci* 28(47), 12453-64.

- Reyes-Turcu, F. E., Ventii, K. H., and Wilkinson, K. D. (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. *Annu Rev Biochem* 78, 363-97.
- Roux, M. J., Martinez-Maza, R., Le Goff, A., Lopez-Corcuera, B., Aragon, C., and Supplisson, S. (2001). The glial and the neuronal glycine transporters differ in their reactivity to sulfhydryl reagents. *J Biol Chem* 276(21), 17699-705.
- Roux, M. J., and Supplisson, S. (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 25(2), 373-83.
- Russell, C., and Stagg, S. M. New insights into the structural mechanisms of the COPII coat. *Traffic* 11(3), 303-10.
- Sato, K., Adams, R., Betz, H., and Schloss, P. (1995). Modulation of a recombinant glycine transporter (GLYT1b) by activation of protein kinase C. *J Neurochem* 65(5), 1967-73.
- Schmid, J. A., Scholze, P., Kudlacek, O., Freissmuth, M., Singer, E. A., and Sitte, H. H. (2001). Oligomerization of the human serotonin transporter and of the rat GABA transporter 1 visualized by fluorescence resonance energy transfer microscopy in living cells. *J Biol Chem* 276(6), 3805-10.
- Scholze, P., Freissmuth, M., and Sitte, H. H. (2002). Mutations within an intramembrane leucine heptad repeat disrupt oligomer formation of the rat GABA transporter 1. *J Biol Chem* 277(46), 43682-90.
- Sheldon, A. L., Gonzalez, M. I., Krizman-Genda, E. N., Susarla, B. T., and Robinson, M. B. (2008). Ubiquitination-mediated internalization and degradation of the astroglial glutamate transporter, GLT-1. *Neurochem Int* 53(6-8), 296-308.
- Sigismund, S., Argenzio, E., Tosoni, D., Cavallaro, E., Polo, S., and Di Fiore, P. P. (2008). Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 15(2), 209-19.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., and Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(8), 2760-5.
- Singer, P., Boison, D., Mohler, H., Feldon, J., and Yee, B. K. (2007). Enhanced recognition memory following glycine transporter 1 deletion in forebrain neurons. *Behav Neurosci* 121(5), 815-25.
- Sitte, H. H., Farhan, H., and Javitch, J. A. (2004). Sodium-dependent neurotransmitter transporters: oligomerization as a determinant of transporter function and trafficking. *Mol Interv* 4(1), 38-47.
- Smith, K. E., Borden, L. A., Wang, C. H., Hartig, P. R., Branchek, T. A., and Weinshank, R. L. (1992). Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 42(4), 563-9.
- Sorkina, T., Doolen, S., Galperin, E., Zahniser, N. R., and Sorkin, A. (2003). Oligomerization of dopamine transporters visualized in living cells by fluorescence resonance energy transfer microscopy. *J Biol Chem* 278(30), 28274-83.

- Sorkina, T., Hoover, B. R., Zahniser, N. R., and Sorkin, A. (2005). Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic* 6(2), 157-70.
- Sorkina, T., Miranda, M., Dionne, K. R., Hoover, B. R., Zahniser, N. R., and Sorkin, A. (2006). RNA interference screen reveals an essential role of Nedd4-2 in dopamine transporter ubiquitination and endocytosis. *J Neurosci* 26(31), 8195-205.
- Spike, R. C., Watt, C., Zafra, F., and Todd, A. J. (1997). An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 77(2), 543-51.
- Staros, J. V., Kotite, N. J., and Cunningham, L. W. (1992). Membrane-impermeant cross-linking reagents for structural and functional analyses of platelet membrane glycoproteins. *Methods Enzymol* 215, 403-12.
- Sur, C., and Kinney, G. G. (2007). Glycine transporter 1 inhibitors and modulation of NMDA receptor-mediated excitatory neurotransmission. *Curr Drug Targets* 8(5), 643-9.
- Torres, G. E., Carneiro, A., Seamans, K., Fiorentini, C., Sweeney, A., Yao, W. D., and Caron, M. G. (2003). Oligomerization and trafficking of the human dopamine transporter. Mutational analysis identifies critical domains important for the functional expression of the transporter. *J Biol Chem* 278(4), 2731-9.
- Torres, G. E., Yao, W. D., Mohn, A. R., Quan, H., Kim, K. M., Levey, A. I., Staudinger, J., and Caron, M. G. (2001). Functional interaction between monoamine plasma membrane transporters and the synaptic PDZ domain-containing protein PICK1. *Neuron* 30(1), 121-34.
- Traub, L. M. (2009). Tickets to ride: selecting cargo for clathrin-regulated internalization. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(9), 583-96.
- Traub, L. M., and Lukacs, G. L. (2007). Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs. *J Cell Sci* 120(Pt 4), 543-53.
- Tsai, G., Ralph-Williams, R. J., Martina, M., Bergeron, R., Berger-Sweeney, J., Dunham, K. S., Jiang, Z., Caine, S. B., and Coyle, J. T. (2004). Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(22), 8485-90.
- Ungewickell, E. J., and Hinrichsen, L. (2007). Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol* 19(4), 417-25.
- Urbe, S. (2005). Ubiquitin and endocytic protein sorting. *Essays Biochem* 41, 81-98.
- Vandenberg, R. J., Shaddick, K., and Ju, P. (2007). Molecular basis for substrate discrimination by glycine transporters. *J Biol Chem* 282(19), 14447-53.
- Wang, H. Y., Altman, Y., Fang, D., Elly, C., Dai, Y., Shao, Y., and Liu, Y. C. (2001). Cbl promotes ubiquitination of the T cell receptor zeta through an adaptor function of Zap-70. *J Biol Chem* 276(28), 26004-11.



- Wang, T. F., Ding, C. N., Wang, G. S., Luo, S. C., Lin, Y. L., Ruan, Y., Hevner, R., Rubenstein, J. L., and Hsueh, Y. P. (2004). Identification of Tbr-1/CASK complex target genes in neurons. *J Neurochem* 91(6), 1483-92.
- Wendeler, M. W., Paccaud, J. P., and Hauri, H. P. (2007). Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 8(3), 258-64.
- Wentholt, R. J., Hunter, C., Wada, K., and Dechesne, C. J. (1990). Antibodies to a C-terminal peptide of the rat brain glutamate receptor subunit, GluR-A, recognize a subpopulation of AMPA binding sites but not kainate sites. *FEBS Lett* 276(1-2), 147-50.
- Werman, R., Davidoff, R. A., and Aprison, M. H. (1967). Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature* 214(5089), 681-3.
- West, K. L., Castellini, M. A., Duncan, M. K., and Bustin, M. (2004). Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol Cell Biol* 24(9), 3747-56.
- Westergren, I., Nystrom, B., Hamberger, A., Nordborg, C., and Johansson, B. B. (1994). Concentrations of amino acids in extracellular fluid after opening of the blood-brain barrier by intracarotid infusion of protamine sulfate. *J Neurochem* 62(1), 159-65.
- Wolkenberg, S. E., and Sur, C. Recent progress in the discovery of non-sarcosine based GlyT1 inhibitors. *Curr Top Med Chem* 10(2), 170-86.
- Yamashita, A., Singh, S. K., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. (2005). Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature* 437(7056), 215-23.
- Yee, B. K., Balic, E., Singer, P., Schwerdel, C., Grampp, T., Gabernet, L., Knuesel, I., Benke, D., Feldon, J., Mohler, H., and Boison, D. (2006). Disruption of glycine transporter 1 restricted to forebrain neurons is associated with a procognitive and antipsychotic phenotypic profile. *J Neurosci* 26(12), 3169-81.
- Young, A. (2007). Structural insights into the clathrin coat. *Semin Cell Dev Biol* 18(4), 448-58.
- Zafra, F., Aragon, C., and Gimenez, C. (1997). Molecular biology of glycinergic neurotransmission. *Mol Neurobiol* 14(3), 117-42.
- Zafra, F., Aragon, C., Olivares, L., Danbolt, N. C., Gimenez, C., and Storm-Mathisen, J. (1995a). Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 15(5 Pt 2), 3952-69.
- Zafra, F., and Gimenez, C. (1986). Characterization of glycine uptake in plasma membrane vesicles isolated from cultured glioblastoma cells. *Brain Res* 397(1), 108-16.
- Zafra, F., and Gimenez, C. (1988). Efflux and exchange of glycine by plasma membrane vesicles isolated from glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta* 946(2), 202-8.
- Zafra, F., and Gimenez, C. (2008). Glycine transporters and synaptic function. *IUBMB Life* 60(12), 810-7.

- Zafra, F., Gomeza, J., Olivares, L., Aragon, C., and Gimenez, C. (1995b). Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur J Neurosci* 7(6), 1342-52.
- Zafra, F., Poyatos, I., and Gimenez, C. (1997). Neuronal dependency of the glycine transporter GLYT1 expression in glial cells. *Glia* 20(2), 155-62.
- Zomot, E., Bendahan, A., Quick, M., Zhao, Y., Javitch, J. A., and Kanner, B. I. (2007). Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters. *Nature* 449(7163), 726-30.